

⑫ 公表特許公報(A)

平5-503708

⑬ 公表 平成5年(1993)6月17日

⑭ Int.Cl.^{*} 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求
 C 07 K 7/08 8318-4H 予備審査請求 有 部門(区分) 3(2)
 8931-4B C 12 N 15/00 A
 7236-4B 5/00 B※
 (全 18 頁)

⑯ 発明の名称 GPIb α フラグメント及び組換えDNA発現ベクター

⑰ 特 願 平3-507976

⑱ 出 願 平3(1991)1月4日

⑲ 翻訳文提出日 平4(1992)7月2日

⑳ 国際出願 PCT/US91/00087

㉑ 国際公開番号 WO91/09814

㉒ 国際公開日 平3(1991)7月11日

優先権主張 ㉓ 1990年1月4日 ㉔ 米国(US) ㉕ 460,674

⑳ 発 明 者 ルツジエリ ツアヴェリオ エ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ポーネ
 ンメ ア ストリート 644

㉑ 出 願 人 スクリップス クリニック ア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ トーリ
 ンド リサーチ ファウンダー ー バインス ロード 10666
 ション

㉒ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外7名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域
 特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広
 域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. 血小板膜糖蛋白質Ib及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現する糖蛋白質Ibへのフォン・ウィルブラント因子の結合を阻害するペプチドであって、以下のペプチドの群:

NLDRCELTKLQVDGT
 QVDGTLPLVLTLDLS
 TLDLSHNQLQSLPLL
 QTLPALTVLDVSPNR
 LKTLPPGLLTPTPKL
 NCEILYFRRWLQDNA
 QDNAENVYVWKQGV
 SNVASVQCDSNDKFP

から選択されるペプチド。

2. アミノ酸配列: NLDRCELTKLQVDGTを有し、グリコカリシンのアミノ末端の残基61〜75を構成する請求項1記載のペプチド。
 3. アミノ酸配列: QVDGTLPLVLTLDLSを有し、グリコカリシンのアミノ末端の残基71〜85を構成する請求項1記載のペプチド。
 4. アミノ酸配列: TLDLSHNQLQSLPLLを有し、グリコカリシンのアミノ末端の残基81〜85を構成する請求項1記載のペプチド。
 5. アミノ酸配列: QTLPALTVLDVSPNRを有し、グリコカリシンのアミノ末端の残基97〜111を構成する請求項1記載のペプチド。
 6. アミノ酸配列: LKTLPPGLLTPTPKLを有し、グリコカリシンのアミノ末端の残基136〜150を構成する請求項1記載のペプチド。
 7. アミノ酸配列: NCEILYFRRWLQDNAを有し、グリコカリシンのアミノ末端の残基210〜224を構成する請求項1記載のペプチド。
 8. アミノ酸配列: QDNAENVYVWKQGVを有し、グリコカリシンのアミノ末端残基221〜235を構成する請求項1記載のペプチド。
 9. アミノ酸配列: SNVASVQCDSNDKFPを有し、グリコカリシンのアミノ末端残基241〜255を構成する請求項1記載のペプチド。

10. 請求項1記載のペプチドのアミノ酸配列の配列サブセット又はその誘導体を有し、血小板膜糖蛋白質Ib及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現する糖蛋白質Ibに対するフォン・ウィルブラント因子の結合を阻害するペプチド。
 11. 請求項1又は請求項10記載のペプチドの誘導体であって、付加的なペプチド配列を有する誘導体。

12. 血小板の活性化又は凝集及び/又は血小板の表面への接着を阻害する方法であって、前記活性化、凝集又は接着を阻害する効果的な量の請求項1、10又は11記載のペプチドと前記血小板を接触させることを含む方法。
 13. 患者の血栓症を阻害する方法であって、前記患者に、前記血栓症を阻害する効果的な量で、請求項1、10又は11記載のペプチドを投与する方法。
 14. 請求項1記載の2以上のペプチドを含む組成物。
 15. 請求項1又は11記載のペプチドの誘導体であって、エステル化、アセチル化又はグリコシル化形態である誘導体。
 16. 血小板膜糖蛋白質Ib及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現する糖蛋白質Ibに対するフォン・ウィルブラント因子の結合を阻害するポリマーであって、以下の多重ドメイン:

ドメインA— GPIb α の45 kDaアミノ末端フラグメントのアミノ酸配列のサブセットを構成する、一連のアミノ酸、

ドメインB— GPIb α の45 kDaアミノ末端フラグメントのアミノ酸配列のサブセットを構成し、ドメインAの一連のアミノ酸と同一でも異なってもよい一連のアミノ酸、及び

ドメインC— ドメインAとドメインBとを結合するリンカー、を含むポリマー。

17. ドメインAとドメインBとが同一である請求項16記載のポリマー。
 18. ドメインAとドメインBとが異なる請求項16記載のポリマー。
 19. 前記リンカーが、モノマー又はポリマーを含む請求項16記載のポリマー。
 20. 前記リンカーが、アミノ酸の配列を含む請求項16記載のポリマー。
 21. 前記ドメインAが、QVDGTLPLVLTLDLS又はTLDLSH

- NQLQSLPLLLを含む、ドメインBがSDKFPVYKYPGKGCP TLGDEGDTLDLYDYYを含む請求項1記載のポリマー。
22. 前記ドメインAがQVDGTLPLVLTLDLS又はTLDLSHN QLQSLPLLLのアミノ酸配列のサブセットを含む、前記ドメインBがSDKFPVYKYPGKGCP TLGDEGDTLDLYDYYのアミノ酸配列のサブセットを含む請求項1記載のポリマー。
23. 血小板膜糖蛋白Ib及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現する糖蛋白Ibに対するフォン・ウィルブラント因子の結合を阻害する合成ポリマーであって、糖蛋白Ibα鎖の1以上のアミノ酸配列を含む、前記配列がその天然のコンフォメーションにおける前記Ibα鎖の表面で又はその付近に通常位置し、かつフォン・ウィルブラント因子と相互作用することができる合成ポリマー。
24. 血小板の活性化又は凝集及び/又は血小板の表面への接着を阻害する方法であって、前記血小板を、前記活性化、凝集又は接着を阻害するのに有効な量の、請求項1記載の誘導体と接触させることを含む方法。
25. 患者における血栓症を阻害する方法であって、前記患者に、血栓症を阻害するのに効果的な量の、請求項1記載の誘導体と投与することを含む方法。
26. 血小板の活性化又は凝集及び/又は血小板の表面への接着を阻害する方法であって、前記血小板を、前記活性化、凝集又は接着を阻害するのに有効な量の、請求項1記載のポリマーと接触させることを含む方法。
27. 血小板の活性化又は凝集及び/又は血小板の表面への接着を阻害する方法であって、前記血小板を、前記活性化、凝集又は接着を阻害するのに有効な量の、請求項2記載のポリマーと接触させることを含む方法。
28. 患者における血栓症を阻害する方法であって、前記患者に、血栓症を阻害するのに効果的な量の、請求項1記載のポリマーを投与することを含む方法。
29. 患者における血栓症を阻害する方法であって、前記患者に、血栓症を阻害するのに効果的な量の、請求項2記載のポリマーを投与することを含む方法。
40. 前記ヌクレオチド配列が、約Ser¹¹¹から約Tyr¹¹⁷のアミノ酸配列をコードする請求項3記載のプラスミド又はベクター。
41. 前記ヌクレオチド配列が、更にシグナルペプチドをコードする請求項3記載のプラスミド又はベクター。
42. pCDM8、pCDM8⁺、pCDNA1、pCDNA1⁺、pUAM、pUAM⁺又はRc/CNVから由来する、請求項3記載のプラスミド。
43. 請求項3記載の発現プラスミド又はウイルス発現ベクターで形質転換した哺乳類宿主細胞。
44. グリコカリシンの本質的に4.5 kDaのトリプシン消化フラグメントを含むポリペプチドを発現しかつ分泌することのできる、請求項43記載の宿主細胞。
45. グリコカリシンの4.5 kDaトリプシン消化フラグメントの生物学的活性を有するポリペプチドを産生させる方法であって、以下の工程：
前記4.5 kDaフラグメントを含むアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の発現を、哺乳類細胞において指示することによる、安定で、染色体外の複製可能なプラスミド又はウイルス発現ベクターであって、前記ヌクレオチド配列が更に、前記アミノ酸配列の一部として、前記4.5 kDaフラグメントに対して本来のものではなくかつ前記4.5 kDaフラグメントのカルボキシ末端に配位するアミノ酸をコードする、プラスミド又はベクターを提供し、前記哺乳類細胞を、前記プラスミド又はベクターで形質転換し、前記形質転換哺乳類細胞を、前記ポリペプチドを発現するような条件下で保持することを含む方法。
46. 前記プラスミドがpMW1及びpMW2からなる群から選択される請求項45記載の方法。
47. 前記ヌクレオチド配列が、全His¹-Leu¹¹¹グリコカリシンIbαポリペプチドをコードする請求項45記載の方法。
48. 更に、前記ポリペプチドを回収する工程を含む請求項45記載の方法。
49. 前記ヌクレオチド配列がまた、Gln¹¹～Ser¹¹⁸のアミノ酸配列をコード

方法。

30. 血小板の活性化又は凝集及び/又は血小板の表面への接着を阻害する方法であって、前記血小板を、糖蛋白IbαのSer¹¹¹～Tyr¹¹⁷フラグメントと接触させることを含む方法。
31. 患者における血栓症を阻害する方法であって、前記患者に、糖蛋白IbαのSer¹¹¹～Tyr¹¹⁷フラグメントと投与することを含む方法。
32. 前記ドメインBが、SDKFPVYKYPGKGCP TLGDEGDTLDLYDYY、SDKFPVYKYPGKGCP、GKGCP TLGDEGDTLD、GDTLDLYDYYPEEDTE、EEDTE及びEEDTEGD KVRATRTVからなる群から選択されたペプチドを含む請求項1記載のポリマー。
33. 前記ドメインAが、QVDGTLPLVLTLDLS、TLDLSHN QLQSLPLLL、QTLFALT VLOVSFNR及びNLDRC ELTKLVQDGTからなる群から選択されるペプチドを含む請求項1記載のポリマー。
34. pMW1又はpMW2の同定特性を有するpCDM8⁺ベースの発現プラスミド。
35. 請求項34記載のプラスミドで形質転換した宿主細胞。
36. 血小板膜糖蛋白Ibに対するフォン・ウィルブラント因子の結合を阻害するポリマーをコードする組換えDNA発現プラスミド又はウイルス発現ベクターであって、前記プラスミド又はベクターが、血小板膜糖蛋白Ibαのアミノ末端領域の約His¹から約Ala¹¹⁸までのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列又はその1以上の配列サブセットを含むプラスミド又はベクター。
37. 前記ヌクレオチド配列が、約His¹から約Thr¹¹⁴までのアミノ酸配列をコードする請求項36記載のプラスミド又はベクター。
38. 前記ヌクレオチド配列が、約GLY¹¹⁷から約GLU¹¹⁸までのアミノ酸配列をコードする請求項36記載のプラスミド又はベクター。
39. 前記ヌクレオチド配列が、またGln¹¹～Ser¹¹⁸のアミノ酸配列をコードする請求項36記載のプラスミド又はベクター。
40. 前記ヌクレオチド配列が、またGln¹¹～Ser¹¹⁸のアミノ酸配列をコードする請求項36記載のプラスミド又はベクター。
50. レトロウイルス又はパキウイルスに基づく請求項38記載のウイルス発現ベクター。
51. 本質的に残基His¹から残基Ala¹¹⁸のアミノ酸配列又はその1以上の配列サブセットからなるグリコカリシンIbαのフラグメントをコードするDNA配列。
52. ポリペプチドの発現を指示することができかつ請求項51のDNA配列の上流に転写プロモーターを含む、発現プラスミド又はウイルス発現ベクター。
53. 請求項52記載の発現プラスミド又はウイルス発現ベクターであって、前記糖蛋白IbαをコードするDNA配列の上流にあって、適当な脱離でシグナルペプチドをコードする配列を含む、前記シグナル配列が、真核細胞からの分泌を指示し又は促進することのできるプラスミド又はベクター。
54. 請求項52記載の発現プラスミド又はウイルス発現ベクターで形質転換した組換え真核又は原核宿主細胞。
55. 約残基His¹から約残基Ala¹¹⁸のアミノ酸配列又はそのサブフラグメントを含む成熟糖蛋白Ibαのフラグメントに対応するDNAから、生物学的に活性なポリペプチドを産生させる方法であって、以下の工程。
(1) DNA配列であって、その第1の領域が前記フラグメント又はサブフラグメントをコードし、その第2の領域がシグナルペプチドをコードし、前記第2の領域が前記第1の領域の上流に位置しかつそれと適当な脱離となっている、DNA配列を構成し、
(2) 前記DNA配列を適当なプラスミド又はベクターに挿入して、発現プラスミド又はウイルス発現ベクターを含む構成物であって、前記フラグメント又はサブフラグメントを真核細胞内で発現させかつそこから分泌させることを指示することができる構成物を創製し、
(3) 真核宿主細胞を前記発現プラスミド又はウイルス発現ベクターで形質転換し、そして
(4) 前記形質転換宿主細胞を、前記フラグメント又はサブフラグメントを酸

宿主細胞内で発現させかつそこから分泌させるような条件下で保持し、前記条件がまた、1以上のコンフォメーション依存性糖蛋白質Ib α 特異性抗体によって認識される三次構造を有するフラグメント又はサブフラグメントを生成させる、

ことを含む方法。

56. 前記フラグメント又はサブフラグメントのグリコシル化を行う請求項55記載の方法。

57. 糖蛋白質Ib α のHis¹-Thr¹¹¹又はHis¹-Ala¹¹¹フラグメント又はその1以上の配列サブセットから本質的に異なる生物学的に活性なポリペプチドであって、組換えDNA分子のクローニングを利用する方法によって産生されるポリペプチド。

58. 血小板糖蛋白質Ib α によって提供される三次構造のドメインを有する請求項57記載のポリペプチド。

59. 前記フラグメント又はサブセットフラグメントが、糖蛋白質Ib β 又はIIXの同時発現のなしに、生物学的に活性な構造に組み込まれる請求項55記載の方法。

60. 前記宿主細胞が、分泌のためのプロセッシングすべき蛋白質として、前記糖蛋白質Ib α フラグメント又はサブフラグメントを認識する請求項55記載の方法。

61. 血小板へのフォン・ウィルブラント因子の結合を阻害するのに有効な請求項57又は58記載の1以上のポリペプチド構造及び薬学的に許容されるキャリアーを含む治療組成物。

62. 血小板の活性化及び/又は凝集を阻害する方法であって、前記血小板を、効果的量の請求項61記載の組成物と接触させることを含む方法。

63. 血小板の表面への接着を阻害する方法であって、前記血小板を、効果的量の請求項61記載の組成物と接触させることを含む方法。

64. 患者の血栓症を阻害する方法であって、前記患者に、効果的量の請求項61記載の組成物を投与することを含む方法。

65. 糖蛋白質Ib α 又はその1以上の配列サブセットを含むポリペプチドに対

して特異性を有する抗体であって、動物を請求項57又は58記載のポリペプチドで免疫し、次いでそれから特定の抗体を分離する方法によって産生される抗体。

66. 全長GP1b (a) ポリペプチドHis¹-Leu¹¹⁰又はそのフラグメントを発現させる方法であって、以下の工程:

(1) 前記全長ポリペプチド又はそのフラグメントをコードするDNA配列を構成し、

(2) 前記DNA配列を適当なプラスミド又はベクターに挿入して、発現プラスミド又はウイルス発現ベクターを含む構成物であって、前記全長ポリペプチド又はそのフラグメントの細胞内での発現を指示することのできる構成物を創製し、

(3) 前記発現プラスミド又はウイルス発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、そして

(4) 前記全長ポリペプチド又はそのフラグメントを発現する条件下で前記形質転換宿主細胞を保持する、

ことを含む方法。

67. 前記全長ポリペプチドHis¹-Leu¹¹⁰又はそのフラグメントが、糖蛋白質Ib β 又はIIXの同時発現がなくても、発現する請求項66記載の方法。

明細書

GP1b α フラグメント及び組換えDNA発現ベクター

関連出願の参照

本出願は、1990年11月14日に出版された米国特許出願第07/613,083号の部分継続出願であり、前記米国特許出願第07/613,083号は、1987年11月17日に出版された米国特許出願第07/121,454号の部分継続出願である、1990年1月4日に出版された米国特許出願第07/460,674号の部分継続出願である。

上記米国特許出願第07/460,674号に記載されかつ請求された発明は、フォン・ウィルブラント (von Willebrand) 因子 (vWF) の血小板膜糖蛋白質Ib (GP1b) への結合を阻害するのに有用な蛋白質群に関する。本出願は、上記出願の主題に関連し、更に vWFのGP1b α への結合を阻害するのに有用なペプチド及びポリペプチド、例えば、上記出願 (674) で言及されているペプチドやポリペプチドをコードする新規な DNA発現ベクターに関する。

発明の分野

本発明は、(1)巨核球系の細胞の表面で発現した血小板膜糖蛋白質Ib及びGP1bに対するフォン・ウィルブラント因子の結合を阻止するペプチド及びポリペプチド、(2)血小板の活性化、凝集及び表面接着を防止するためにこれらのペプチド及びポリペプチドを使用すること、及び(3)血栓症防止のためにこれらのペプチド及びポリペプチドを使用することに関する。本発明はまた、(4) vWFのGP1bへの結合を阻害するペプチド及びポリペプチドであって、そのペプチド及びポリペプチドが血小板膜糖蛋白質Ib α (GP1b α) のアミノ末端領域又はその配列サブセットを含むペプチド及びポリペプチドをコードする組換えDNA発現ベクター及び/又はかかるベクターによって形質転換された宿主細胞に関する。これらのベクターは、例えば、血小板の活性化、凝集及び表面接着の阻害並びに血栓症の防止に使用できるペプチド及びポリペプチドの産生に有用である。

例えば、外傷、手術又は病気のような状態によって、血管の内皮表面 (lining) が破壊されて、内皮下結合組織が血液に露されると、初期止血応答として一次止血と呼ばれる血小板の栓の形成が起こる。この過程の重要な出来事の一つは、露かれた内皮下組織に血小板が接着することである。vWFは、血小板膜の表面に見られるGP1b受容体と、血管の内皮下層に見られる内皮下コラーゲン繊維とに結合することによって、この接着に介在する。vWFによるこの作用によって、例えば小さい血管における高い流速によって送られるような、損傷を受けた又は閉塞の組織でしばしば見られる高い剪断応力の条件下において、血小板の接着が起こる。この作用は、毛細管、小動脈及び小静脈からの血液の喪失を防止するのに非常に重要である。

vWF及びGP1bの間のこの重要な相関関係は、バーナード・ソウリエ (Bernard Soulier) 症候群の出血性体質によって示唆される。この症候群は、GP1bの量の減少又は機能異常、従って vWFがGP1bに結合しえないことによって著しく血小板接着が減少することによって特徴付けられる異常である。

vWF-GP1b相互作用の阻害によって、一次止血が阻害され、また血管の閉塞が重要な役割を負っている病気を予防するのに有用な、抗血栓症状態を引き起こすことが予想される。GP1bの蛋白質分解フラグメント及び、本発明のベクターを使用して製造したペプチド及びポリペプチドは、vWFのGP1bへの結合を阻害することによって抗血栓症剤として作用し得る。

技術的な背景について説明すると、GP1bは、約180 kDaの見掛け分子量 (molecular mass) を有する2つの鎖からなる分子である。GP1bは、約22 kDaの分子量を有する鎖 (ベータ又はGP1b β) に対するジスルフィド結合により連結されている約145 kDaの分子量からなる重鎖 (アルファ又はGP1b α) からなる。GP1bは一体の膜蛋白質であり、上記アルファ鎖及びベータ鎖の両方ともトランスメンブレイン (transmembrane) 領域を有する。内因性のカルシウム依存性血小板プロテアーゼによる蛋白質分解によって、GP1b α のアミノ末端部分から蛋白質分解フラグメントが生じる。このフラグメントは、グリコカリシン (glycocalicin) として知られており、140 kDaの近似の分子量を有するほぼ全体のGP1b α 鎖からなっている。このフラグメントは、GP1b α の細胞外領域

から由来し水溶性である。従って、膜分子から分断されると、このフラグメントは放出される。

ヒトGP1b α ポリペプチドをコードする完全なcDNAは、Lopez らのProc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:5615-5617 (1987) という、先行技術にならない文献で決定されている。便宜上、ここでは上記Lopez らのアミノ酸番号付系に従う。また、GP1b α の遺伝子は、プローブとして部分的なcDNAを使用して、ゲノム性コスミドライブラリーからクローニングされた。イントロンを含めたその配列はWengerによって決定された (Biochemical and Biophysical Research Communications, 156(1):389-395 (1988))。ここでは、Wengerのヌクレオチド番号付系に従う。

予想されるGP1b α 配列は、16個のアミノ酸からなるシグナルペプチド (Ne⁺ -Pro⁺) 及びこの後に続く610個のアミノ酸からなる成熟ペプチド又はポリペプチド領域 (His¹-Leu⁶¹⁰) からなる。表1に示されるように、45 kDaのトリプシン分解フラグメントの完全な配列は、His¹乃至Arg⁵⁵⁵又はArg⁵⁵⁵を含む。本出願においては、GP1b α 及びグリコカリシンは、同一のアミノ末端を有し、大きさがほぼ同一であるので、グリコカリシンフラグメント及びGP1b α フラグメントに関する言及においては、等価のものとなされる。

トリプシンは、残基 Arg⁵⁵⁵/Ala⁵⁵⁵及び/又は Arg⁵⁵⁵/Thr⁵⁵⁵の間でグリコカリシンを分裂させて、2種類のフラグメント、即ち、一つは45 kDaの見掛け分子量を有し、アミノ末端残基 His¹ 乃至 Arg⁵⁵⁵ 又は Arg⁵⁵⁵ から延びているフラグメント、及び他のものは、84 kDaの見掛け分子量を有し、炭水化物に大変富み、かつ Ala⁵⁵⁵ 又は Thr⁵⁵⁵ から始まるグリコカリシンのカルボキシル末端半分を提供するフラグメントを生じさせる。45 kDaフラグメントは、1本鎖体及び2本鎖体からなる。後者は、残基 Lys⁵⁵⁵ 及び Ala⁵⁵⁵ の間でトリプシンによる付加的な開裂により生じ、この場合、1以上の鎖間ジスルフィド結合によって結合された、見掛け分子量がそれぞれ35 kDa及び7 kDaの2種のポリペプチドとなる。1本鎖体及び2本鎖体の相対的な割合は、グリコカリシンのトリプシン開裂の程度による。例えば、酵素対基質比が1:200 (w/w)で18時間消化すると、2本鎖体が優先的に生じる。この種の2本の

鎖は、ジスルフィド結合の還元及びそれによって生じるスルフィドリル基を、例えばモル過剰のジチオトレイトールで処理し及びヨードアセトアミドでS-カルボキシイミドメチル化することによって末端をブロックすることにより、分離することができる。

発明の要旨

上記米国出願第07/470,674号に記載されるように、以下の表1に示されるアミノ酸配列から選択されたグリコカリシンの45 kDaアミノ末端トリプシン分解フラグメントのペプチドを含む、かつ血小板膜糖蛋白b及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現するGP1bへのフォン・ウィルブラント因子の結合を阻害するペプチドが提供される。

表1

10	20	30	40	50	60
HPICEVSKVAHSLVENCCKKRLTALFPDLPKDTTILHLSENLKLYTSLATIKPYTRLTQL					
70	80	90	100	110	120
NLDRCCLTKLQVGGTLPVLGTLGLSHNQLQSLVLEGGTLPALTVDVSNFRLTSLPLGAL					
130	140	150	160	170	180
RGLGELQELLYLKGWELKTLFPGLLTFTPKLGLSLAMNNLTLPAGLLNGLENLTLLQ					
190	200	210	220	230	240
ENSLYTIPTKGGFFGSHLLPFAFLHGNPNLNCCEILYFRRLQDAENNVYVWQGVGVKANT					
250	260	270	280	290	
ENVASVQCNDKDFVYKYPGKCGCTLQDQDGLDLYDYFFZEDTEGDKVRAIR					

更に、本発明は、上記表1に記載のアミノ酸配列から選択されたグリコカリシンの45 kDaアミノ末端トリプシン分解フラグメントの配列サブセットであって、GP1b及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現したGP1bへのvWFの結合を阻害するサブセットを含む。

更に、本発明は、GP1b及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現したGP1bへのvWFの結合を阻害し、以下のペプチドからなるペプチド群から選択されたペプチドを含む。

DKRWLTALFPDLPKDTT; NLTALFPDLPKDTT; FPDLPKDTTILHLSE;
PGLLTFTPKLGLSL; KQGVGVKANTENVAS; GDTLDYDYFFZEDTE;
KEDETEGDKVRAIRTV; FPDLPKDTT; ZEOTE.

更に好ましいペプチドは、GP1b及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現したGP1bへのvWFの結合を阻害するペプチドのアミノ酸の配列サブセットのペプチドである。

更に、本発明は、一般式: (KR)_n (nは2~10) 又はR_n (nは2~20) で示されるペプチド、及びGP1b及び/又は巨核球系統細胞の表面に発現したGP1bへのvWFの結合を阻害するこれらの誘導体を含む。

本発明は更に、効果的な量の上記ペプチド又はサブセット又はここで記載される他のポリマーにより、血小板の活性化、表面への血小板の接着及び血小板相互の凝集を阻止する方法を提供する。

更に、本発明は、上記ペプチド又はサブセット若しくはここに記載される他のポリマーの効果的な量を患者に投与することを含む、その患者における血栓症を治療する方法を提供する。

上記米国出願 '574の明細書に記載されるように、GP1b α ポリペプチドをコードする完全なcDNAはLopez によって決定されている。かかる情報によれば、ヌクレオチド配列は、45 kDaフラグメントからペプチドを発見させるた

めに適当なベクターに挿入することができる。従って、本発明の更に別の特徴によれば、GP1b α へのvWFの結合を阻害するペプチド又はポリペプチドをコードする組換えDNA発現ベクターが提供される。このベクターは、GP1b α のアミノ末端領域の His¹ ~ Leu⁵⁵⁵ のアミノ酸配列、又はその配列サブセットをコードするヌクレオチド配列を含む。特に好ましいのは、GP1b α の His¹ ~ Thr⁵⁵⁵ のアミノ酸配列を含むペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターである。

本発明は、更に、カルボキシル末端領域において及びそれを超えて、グリコカリシンの45 kDaのトリプシン分解フラグメントを含むペプチドをコードする組換えDNA発現ベクターであって、適当な形質転換された宿主細胞において発現させた場合に、上記45 kDaフラグメントの生物学的活性を有するペプチドを産生するベクターに関する。

本発明は、また上記ベクターで形質転換した宿主細胞に関する。特に、好ましい宿主細胞は哺乳類の宿主細胞である。

本発明の別の特徴は、グリコカリシンの45 kDaトリプシン分解フラグメントの生物活性を有するペプチド又はポリペプチドを製造する方法であって、そのペプチドを発見する条件下で上記形質転換宿主細胞を保持する方法に関する。

本発明の更に別の特徴は、全長GP1b α ポリペプチド (His¹ ~ Leu⁵⁵⁵) 又はそのサブフラグメントを発見する方法であって、全長ポリペプチドをコードするDNA配列を合成し、そのDNA配列を、前記適当なプラスミド又はベクターに挿入し、その変性プラスミド又はベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換宿主細胞を、全長ポリペプチド又はそのフラグメントをその宿主細胞内で発現するような条件下で保持する方法に関する。

図面の簡潔な説明

図1は、GP1b α の45 kDaアミノ末端領域のペプチドサブフラグメントの、血小板GP1b受容体へのリストセチン依存性及びボトロセチン (batroctatin) 依存性vWF結合に対する阻害効果を示す型である。

図2は、残基位置271~285からなるGP1b α ペプチドフラグメントの、

血小板GP1b受容体へのボトロセチン依存性(A)及びリストセチン依存性(B) VWF結合に対する阻害効果を示す2種類の図を示す。

図3は、残基位置251〜277からなるGP1bαペプチドフラグメントの、血小板GP1b受容体へのボトロセチン依存性及びリストセチン依存性 VWF結合に対する阻害効果を示す図である。

図4は、pMFI及びpMFI形質転換細胞によって産生されたGP1bαポリペプチドの、コンフォーマーメーション依存性抗GP1bαモノクローナル抗体への反応性を示すドットプロット図である。

図5は、宿主細胞内におけるpMFIポリペプチドの細胞内プロセッシングを示すイムノプロットである。

図6は、pMFIにより産生されたGP1bα抗原がボトロセチン誘起結合分析において機能的に活性であることを示す図である。

発明の詳細な説明

本開示の目的のために、アミノ酸の受け入れられている略記表示を使用した。その記号は以下の表2に示す。

表2

一文字及び三文字によるアミノ酸の略称。

A	ALA	アラニン
C	CYS	システイン
D	ASP	アスパラギン酸
E	GLU	グルタミン酸
F	PHE	フェニルアラニン
G	GLY	グリシン
H	HIS	ヒスチジン
I	ILE	イソロイシン
K	LYS	リジン
L	LEU	ロイシン

することもできる。

転写：

構造遺伝子からRNAを産生する工程。

翻訳：

mRNAからポリペプチドを産生する工程。

コード化(coding)配列(暗号化(encoding)DNA)：

通常の状況において、蛋白質のアミノ酸をコードするDNA配列。本発明においては、コード化配列の合成又は使用とは、5'-CGG-GGA-GGA-3' (これは3'-GCC-CCT-CCT-5'の相補的ストランドを有する)で示されるように対応する相補的ストランドであって、トリペプチドNH₂-arg-gly-gly-OHをコードするコード化配列の合成又は使用を必然的に含むものと理解される。一本鎖ストランドの増幅又は増利増殖は、他のストランド及び技術の真意によって適当で、有用でありかつ必要なものとしてのその対応する二本鎖ストランドへ普及し又は増利増殖しているものと見なされる。

cDNA：

mRNAテンプレートに存在する配列から断片的に合成されたDNA分子又は配列。

転写ストランド：

mRNAを産生するために、RNAポリメラーゼによって、ヌクレオチド配列が3'-5'で読まれるDNA配列。このストランドは、非コード化ストランドとも呼ばれる。

非転写ストランド：

転写ストランドのアンチパラレルの表現であり、チミン塩基が存在する(mR

M	MET	メチオニン
N	ASN	アスパチン
P	PRO	プロリン
Q	GLN	グルタミン
R	ARG	アルギニン
S	SER	セリン
T	THR	トレオニン
V	VAL	バリン
W	TRP	トリプトファン
Y	TYR	チロシン
B	ASX	Asp又はAsnで、区別なし
Z	GLX	Glu又はGlnで、区別なし
X	X	未決定又は不定型のアミノ酸

意義

ここで他に規定されている場合を除いては、以下の用語は指定された意味を示す。

コドン：

mRNAを通してアミノ酸、翻訳開始信号又は翻訳終止信号をコードする3ヌクレオチドのDNA配列(トリプレット)。例えば、DNAヌクレオチドトリプレットTTA、TTG、CTT、CTC、CTA及びCTGは、アミノ酸ロイシン(LEU)をコードし、TAG、TAA及びTGAは翻訳終止信号であり、そしてATGはメチオニン(MET)をコードする翻訳開始信号である。

構造遺伝子：

対応するメッセンジャーRNA(mRNA)を通して、特定のポリペプチドに特有のアミノ酸配列をコードするDNA配列。構造遺伝子は、一次生成物として、例えば、転写RNA(rRNA)又はリボソームRNA(rRNA)としてRNAを有

NAのウラシル塩基に代わり)ことを除いては、mRNAの塩基配列と同一のストランド。これは、「コード化」と呼ばれる。この理由は、mRNAと同様に、5'→3'を調べた場合に、翻訳のコドンが直読認識できるからである。このストランドは、「コード化(coding)」ストランドとも呼ばれる。

発現：

構造遺伝子によって生産物を産生する工程。蛋白質の生産物の場合には、転写と翻訳との組合せが必要である。

置換えDNA分子：

末端-末端で結合された、異なるゲノムからのDNAのセグメントからなり、ある種の宿主細胞に感染し、そこに保持される能力を有するか又は有するように修飾される分子。

生物学的活性：

生物学的な意味で(即ち、ある生物体又はin vitroの環境において)分子によって実行される又は引き起こされる活動の1以上の機能又は効果。GP1bαのアミノ末端領域の特異的な生物学的活性は、VWFへの結合能力、即ちin vitroにおいて、例えば、リストセチンの存在下における血小板の凝集によって示される活性である。

還元条件：

VWF又はそれから由来するポリペプチドを含む溶液における、「還元」剤の存在に言及。この還元剤は、VWFのジスルフィド結合の分裂を促させる。しかし、当該技術に典型的な使用方法に合わせて、還元剤、例えば、ジチオトレイトール(DTT)は、含まれる硫黄原子の酸化状態に實質的な変化を与えないで、VWFシステインとDDTとの間でジスルフィド結合を形成させることによって、VWFジスルフィド結合を分裂させる。

ファージ又はバクテリオファージ：

細菌に対するウィルスであり、その多くは、蛋白質の外皮又はコート（カプシド）内に収容されたDNA配列からなる。

プロモーター：

遺伝子の上流にあって、その転写を促進するDNA配列。

プラスミド：

プラスミドが宿主細胞において複製するように、完全なレプリコンを有する非染色体性の二重鎖DNA配列。プラスミドが原核又は真核宿主細胞内に置かれた時に、その細胞の特性が、プラスミドのDNAの結果として変化する（形質転換）してもよい。例えば、テトラサイクリン耐性（Tet^r）遺伝子を有するプラスミドが、予めテトラサイクリン感受性の細胞を形質転換して、テトラサイクリンに耐性の細胞に変える場合、プラスミドによって形質転換された細胞は、「形質転換体（transformant）」と呼ばれる。

クローニング又はクローン化：

無性繁殖又はDNA複製によって、一群の生物体、又はその一つの生物体から誘導されたDNA配列又は他の高分子、乃至はその配列を得る工程。

発現プラスミド：

クローニングすべきDNA、例えば、vWF構造遺伝子が挿入されたプラスミド。そこに挿入されたDNA配列は、それから得られたmRNAの翻訳を調節する配列を含んでもよく、また、発現プラスミドの構築又は更なる修飾を有利にする制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでもよい。発現プラスミドは、宿主において暗号化されたポリペプチドの発現を指示し、通常暗号化された構造遺伝子のDNA配列の上流に転写プロモーターを含む。発現プラスミドは、宿主染色体のDNA中に一体化してもしくはなくてもよい。本発明においては、一体化したプラスミドは、それでも発現プラスミドと呼ばれる。

における145の位置に知られている。更に、例えば、成熟ポリペプチドのカルボキシ末端領域の13個のアミノ酸配列（Ser Glu Pro Ala Pro Ser Pro Thr Thr Pro Glu Pro Thr）は、ヒト人口の約半分に於いて2倍頻りに見られる。発見された又は発見されるかも知れないこれらの多形に対して、かかるコード化ポリペプチドの殆どは本発明の実施において効果的であると期待される。

シグナルペプチド（配列）：

小胞体の膜を横切って細胞の分泌通路にポリペプチドを転移させる信号を送る新たに翻訳されたポリペプチドにおけるアミノ酸配列。シグナルペプチドは、蛋白質の初め（アミノ末端）に典型的に生じ、その中心における約5〜15の疎水性アミノ酸の長さを含み、20〜40アミノ酸の長さを有する。典型的には、シグナル配列は、小胞体への転移の過程の間又はそのすぐ後に蛋白質から蛋白質分解的に分裂される。シグナルペプチドをコードする遺伝子又はcDNAの部分もまた、シグナル配列と言う。

用語「ペプチド」及び「ポリペプチド」は、相互に置き代えてここで使用される。

本発明の実施においては、精製グリコカリシンを試験に使用して、フォン・ウィブラント因子の完全な血小板への結合を阻害する際の化合物の効果を評価した。

精製グリコカリシンは、(1)セファロース（Sepharose®）ビーズに不溶化された小量アミノ酸を使用するアフィニティークロマトグラフィー、続いて(2)グリコカリシンに対してセファロースビーズに不溶化されたモノクローナル抗体（LJ-P3）を使用する免疫アフィニティークロマトグラフィーに基づく、2段階操作によって製造される。

古くなった血小板濃縮物を、グリコカリシンの精製のために出発物質として使用した。室温（22〜25℃）で25分間2300gで血小板を沈降させ、上層を除去し、10mMのトリス塩基及び150mMのNaClからなり、HCl（トリ

ウイルス発現ベクター：

ウィルス性発現ベクターは、DNAが天然の生物学的工程を経て、細胞に感染し得るウィルス粒子中に包装されてもよいことを除いては、発現プラスミドと類似している。

下流：

構造遺伝子の転写ストランドのヌクレオチドは、もしそのヌクレオチドがその遺伝子の他の領域の後にRNAポリメラーゼによって通常読まれるのであれば、その他の領域の下流にあると言うことができる。非転写ストランドの相補的ヌクレオチド又はDNAの二重鎖形内の対応する塩基対は、下流とも呼ばれる。

更に、構造遺伝子内における転写及び翻訳の方向に言及すると、その遺伝子の上流（即ち、5'）に付加された制限エンドヌクレアーゼ配列は、蛋白質のアミノ末端をコード化する配列の前にその遺伝子が付加されたことを意味し、一方、構造遺伝子の下流（即ち、3'）に形成された終端は、その遺伝子がカルボキシ末端コード化領域の先にあることを意味する。

糖蛋白質Ibα又はGP1bα：

ここでの糖蛋白質Ibαに対する全ての言及は、ヒトGP1bαにも適用されるものと理解される。

成熟GP1bα：

トランスメンブレイン蛋白質として血小板で典型的に見出されるアミノ酸配列His¹⁴-Leu¹⁴⁴からなるポリペプチドを意味する。更に、哺乳類細胞で発見させる時に、成熟GP1bαは通常グリコシル化される。ヒト糖蛋白質Ibα遺伝子によって暗号化されるアミノ酸配列に関して、ある種の突然変異又は多形（polymorphism）が記載された。トレオニン/メチオニン多形は、成熟GP1bα配列に

ス緩衝塩水：TBS）によってpH7.4に調整された2mMのEDTAを含む緩衝液に血小板ベレットを再懸濁することによって血漿成分を除去した。この操作を2度行った。最初の洗浄の後に、懸濁液を1分間600gで遠心分離を行い、汚染性赤血球細胞のほとんどを含むベレットを、洗浄操作を続ける前に捨てた。最後の遠心分離の後に、2mMのCaCl₂及び0.1mMのフェニルメチルスルホンフルオライド（PMSF）を含むTBSに血小板を再懸濁した。ついで、それらの血小板を音波処理（血小板懸濁液を氷の上に保持して約100ワットで各15秒の3個のバース）によって粉砕した。懸濁液を室温で3時間及び4℃で16〜18時間、常に連続的に攪拌しながら放置した。この後、懸濁液中の粒状物を、12℃で20分間100000gで遠心分離を行うことによって除去した。産んだ上澄液は、シアノゲンブロミドで活性化し、かつ1mMのEDTAと0.1mMのPMSFと0.02%のアジ化ナトリウムを含むTBSで平衡にした。セファロースビーズに結合した小量アミノ酸のカルム（直径2.6cm、高さ11cm）にかけた。ビーズの体積の2倍の体積の緩衝液に添加した100mMのN-アセチルグルコサミンで糖蛋白質を溶出する前に、その緩衝液でカルムを2度洗浄した。全操作は、室温で行った。溶出物質は、シアノゲンブロミドで活性化したセファロースビーズに結合した精製IgGからなるモノクローナル抗体カルム（直径5cm、高さ2.5cm）に直にかけた。使用したモノクローナル抗体（LJ-P3）は、GP1bαのグリコカリシン部分に特異性を有し、その調製、特性及び精製については、ハンダ（Handa）らのJ. Biol. Chem., 261:12579-12585（1986）に記載されている。カルムは、100mMのトリス塩基、500mMのLiCl、1mMのEDTA、0.1mMのPMSF、及び0.02%のアジ化ナトリウムからなり、かつHClでpH7.4に調整された緩衝液で平衡化した。このカルムは、ビーズの体積の3倍の体積の緩衝液で洗浄した。結合グリコカリシンは、1mMのEDTA及び0.1mMのPMSFを含む50mMジエチルアミン、70〜80mMで溶出した。この工程の間、カルムを通る流速は、溶出が20〜25分間で完了するように制御した。全操作は、室温で行った。溶出グリコカリシンは、8gのグリシン中に溶め、ジエチルアミンの高pHを中和した。精製物質は、TBSに対して充分透析し、アクワシド（Aquadex®）で濃縮し、再びT

BS に対して透析した。精製グリコカリシンは、 -70°C でアリコートで貯蔵した。

精製グリコカリシンを、N-トシル-L-フェニルアラニンクロモメチルケトンで前処理したトリプシンで消化した。酵素-基質比を 1:200 とし、 37°C で 16~18 時間反応が進むようにした。量の終わりに、2 倍のモル過剰の (p-アミジノフェニル) メタンサルホニルフルオリドでトリプシン活性を阻害した。トリプシン消化によって生じたグリコカリシンの 4.5 kDa フラグメントを、直列に配置した、1 つの GF450 及び 2 つの GF250 デュポンゾーパックス (Zorbax®) カラム (直径 9.4 mm × 長さ 25 cm) を使用するゲルパーミエーション高性能液体クロマトグラフィーによって精製した。カラムを、200 mM の $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ で pH 7.4 で平衡化した。流速は 1 mL/分とした。この操作は、室温で行った。4.5 kDa フラグメントは鋭いピークとして溶出し、これを収集し、アクワンドで濃縮し、TBS で充分に透析し、使用するまで -70°C でアリコートで保存した。

精製グリコカリシンを使用して、GP1b α のこの蛋白質分解フラグメントが vWF の天然の血小板への結合を阻害できることを示した。分析系は、 ^{125}I -標識 vWF 及び新鮮な又はホルマリン固定血小板の使用に基づく。リストセチンを使用して、vWF の GP1b への結合を誘起した。検出せずに、 37°C で 30 分培養した後、フリーの vWF リガンドからの結合血小板の分離を、タイロッド (Tyrode) 緩衝液における 2.0% クロースによる遠心分離、及びその後における、Ruggieri らの J. Clin. Invest., 72:1-12 (1983) に記載の結合放射能測定によって行った。非特異性結合は、選択したポイントに対して、40 倍過剰の非標識化 vWF の存在下における結合を測定することによって評価した。結合等温式は、Munson の Methods Enzymol., 92:542-576 (1983) に記載のコンピュータ支援プログラム「リガンド」を使用して、Scatchard 型分析方法によって、(非特異性結合の評価を含めて) 結合パラメータを測定することによって評価した。

1 mg/ml の過剰の最終濃度におけるグリコカリシンは、 ^{125}I -標識 vWF の天然 GP1b への結合を完全に防止する。7 つの異なるグリコカリシン調整物に対して、結合を 5.0% 阻害する濃度 (IC_{50} と呼ばれる) は平均で 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であ

った。

次に、グリコカリシンにおける鎮内ジスルフィド結合の全てをモル過剰のジチオトレイトールで処理して還元し、得られたスルフィドヒドシル基を S-カルボキシミドメチル化によって保護した。得られた還元されかつアルキル化されたグリコカリシンは、リストセチンの存在下で、血小板上の完全な GP1b に対する vWF の結合を防止する特性を保持することが分かった。この還元されアルキル化されたグリコカリシンは、鎮内ジスルフィド結合に依存する二次構造を失ったために、この実験は、vWF への相互作用の機能がグリコカリシンの一次構造内の特定の領域に依るものとするところから示す。

グリコカリシンの 4.5 kDa トリプシン分解フラグメントを、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) 及びその分子量に基づき蛋白質を分離するゲルパーミエーションカラムを使用することによって精製した。トリプシン消化に使用した条件のために、4.5 kDa フラグメントは本質的に二重鎖体からなっている。このグリコカリシンの精製された蛋白質分解フラグメントを使用して、血小板の GP1b への vWF の結合をブロックする能力を試験した。4.5 kDa フラグメントは、約 3.5 μM の IC_{50} で、血小板、即ち、GP1b に対する vWF のリストセチン媒介結合を完全に阻害した。

同様の実験において、グリコカリシンをトリプシンで消化し、ジスルフィド結合をジチオトレイトールで還元して、得られたスルフィドヒドシル基をヨードアセトアミドで S-カルボキシミドメチル化した。3.5 kDa のアミノ末端フラグメントをゲルパーミエーション HPLC で精製して、リストセチン媒介分析において血小板 GP1b への vWF の結合に関する阻害効果を調べた。その IC_{50} は、親の非還元 4.5 kDa フラグメントのそれと同様であることが分かった。全グリコカリシンで得られたこれらの結果から、グリコカリシンのアミノ末端領域の一次構造が、その分子の天然の三次元コンフォメーションの維持に依存しない機能を有する、ある種の vWF 結合ドメインを含むことが分かる。

これらの知見に従って、各々が 15 個のアミノ酸残基からなり、グリコカリシンの 4.5 kDa のアミノ末端フラグメントの配列を代表する重複ペプチドを合成した。以下のペプチドが、0.5 mM の IC_{50} 値又はそれよりも低い値において血

小板 GP1b への vWF の結合を阻害することが分かった。(ここで、一文字の記号は、アミノ酸残基の特定に使用したものである。)

DKRNLTALPPDLPKDTT;
NLTAALPPDLPKDTTI;
PPDLPKDITILHLSI

(これらの 3 種のペプチドは相互に重複し、グリコカリシンの残基 ASP¹¹ ~ GLU¹⁸ の配列を含む。)

PGLLTPTPKLEKLSL (残基 PRO¹¹ ~ LEU¹⁸);
KQGVVDVKAMTSNVAS (残基 LYS¹¹ ~ SER¹⁸);
GDTDLDYDYPEEDTE;
EEDTEGDKVRATRTV;

(これら 2 種のペプチドは GLY¹¹ ~ VAL¹⁸ を含む。)

これらの結果により、グリコカリシンのアミノ末端領域内に、vWF 結合に対する機能的関連性を有する多重ドメインの存在が示される。

阻害活性を有するより長いペプチドの重複領域に対応する配列を有する、より短いペプチドが合成された。これらのより短いペプチドの 2 つは、阻害活性を有することが分かった。それらの配列は、PPDLPKDIT (グリコカリシンの残基 PRO¹¹ ~ THR¹⁴) 及び EEDTE (残基 GLU¹⁵ ~ GLU¹⁸) である。これらの 2 つのペプチドは、個々に試験した場合に、0.5 mM より大きい IC_{50} 値を有していた。これらを 0.5 mM の濃度で組み合わせると、vWF の GP1b への結合を完全に阻害した。この実験により、グリコカリシンの一次配列における異なる非隣接ドメインが、相乗的に共同して vWF 結合部位、従って、vWF 結合活性を提供できることが分かる。グリコカリシンの 4.5 kDa アミノ末端トリプシン消化フラグメントの配列及びそのサブセット (上記の通り) は、血小板 GP1b への vWF 結合を阻害する能力のある物質を設計するのに有用な情報を含む。

一般式 (KR), (n は 2~7) 及び一般式 R_n のペプチドもまた vWF の GP1b への相互作用を阻害する。一般式 R_n RGDVY 又は (KR), RGDV のペプチドは、GP1b/IIIa へのフィブリノーゲンの結合を阻害することが示された (米国特許第 4,683,291 号、「血小板結合阻害剤 (Platelet Binding I

nhibitors)」。後者のペプチドは、現在 vWF-GP1b 相互作用の阻害において (KR)、類似物と同じ効果のあることが分かり、従って、二官能性抗血小板剤の群を代表する。

主体における vWF の GP1b への結合を開始させる機構は、未だ分かっていない。通常、vWF 及び GP1b は、重大な相互作用を起こさなく、循環中に共存している。露出した又は損傷を受けた内皮下層との接触によって、結合が引き起こされる。多分、vWF が、血管壁と接触した時に、変形した形態 (複合体を形成し得る) を持つと考えられる。Sakariassen ら、Nature, 279:635-638 (1979); Stelら、Blood, 65:85-90 (1985); 及び Turitto ら、Blood, 65:823-831 (1985) を参照。結合に必要なコンフォメーションの変化は、血小板が他の血液成分と接触することにより又は血小板が損傷を受けた血管において高剪断応力に晒されることによって、GP1b 内で誘発される。Moake ら Blood, 71:1368-1374 (1988)。

vWF と GP1b との相互作用は、いくつかの方法によって立証することができる。結合は、リストセチンの存在下に立証することができる。このリストセチンは、高分子間の過剰の負電荷密度を減少させることによって作用すると考えられる糖ペプチドの抗生物質である。Howard らの Thromb. Diath. Haemorrh., 26:362-369 (1971) 及び Collier らの J. Clin. Invest., 60:302-312 (1977) を参照。この相互作用はまた、ある種の蛇毒である蛋白質、ボトロセチンの存在下で生じることがある。Read らの Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 75:4514-4518 (1978) を参照。vWF と GP1b との相互作用はまた、vWF 分子から末端の (負電荷した) シアル酸炭水化物残基を除去することによって高められ得る。De Marco らの J. Clin. Invest., 68:321-328 (1981) を参照。

公知の標準 in vitro 結合分析及び結合阻害分析の in vivo 相関は今不明である。in vitro 結合機構の詳細な検討によって、in vivo 機構又はその重要な特徴を最終的に特定することが出来るかも知れない。異なる実験系で測定された、vWF の GP1b への結合には、高分子の異なる官能性ドメイン又はコンフォメーション状態が含まれる。従って、GP1b に由来しかつ in vivo において vWF 結合の治療的阻害剤として特に有用なこれらのペプチドが、1 以上の in vitro

分析系において、vWF結合の重要な阻害を示すペプチドとなり得る。

更に、GP1bのドメイン、特にvWF結合をもたらすその45 kDaアミノ末端フラグメントのドメインは、アミノ末端ポリペプチドの直線配列に沿って交互に隣接している必要はないが、vWFへのその結合は、アミノ末端フラグメントがその天然の三次構造を持ったときに、基部に近い(proximal)位置になるような、45 kDaポリペプチド全体に分散しているペプチド配列によって達成される。

上記仮定に照らして、本発明の基礎を形成する更に発見的な仕事が行われた。以下に示すように、vWF結合阻害性を増大させるポリマーが開示される。

本発明は、グリコカリシンのアミノ末端部分の多重天然配列(multiple native sequence)から構成した合成ペプチド又はポリペプチドを範囲として含む。このフラグメントは、一次構造においては基部に近くはなく、その三次構造はGP1bの三次元結合ドメインを模倣する結合ドメインの役割をする三次コンフォメーションを有し、vWFに対して高い親和性を有する。

更に、本発明は、GP1bからのアミノ酸配列の多重ドメインであって、ペプチドの特徴を有しても有さなくてもよいリンカーによって連結されている多重ドメインを有する治療用ポリマーを含む。

本発明の実施においては、vWFと血小板との相互作用の阻害剤として、以下の表3で特定される以下のポリマーを使用することが好ましい。

表3

ペプチド	グリコカリシン中の残基位置
(a) SDKFPVYKYPGKGCPTLGDEGDTLDYDY	251-278
(b) NLDRCZLTQVQVDT	41-75
(c) QVDTLPVLTGLDLS	71-85
(d) TLDLQHQQLQSLWLL	81-95
(e) QTLPALTVLDVSFNR	97-111
(f) LKTLPPGLLTPTPKL	116-150
(g) NCEILYFRWLQDWA	210-224
(h) QDAENYVYWKQGVQ	221-233
(i) KQGVDAKMTSVAS	231-245
(j) SNVASVQCNSSDKFP	241-255
(k) SDKFPVYKYPGKGCPT	251-265
(l) GKGCPTLGDEGDTLD	261-279
(m) GDTLDYDYVFXEDTE	271-285

上記ペプチドの内、(a)又は(m)を使用すると、特に好ましい。特に、(a)の使用は最も好ましい。

これらのペプチド並びに本発明の範囲内における他のポリマーは、血小板の活性化、凝集又は表面への接着の阻害又は潜在的な治療用抗血栓剤として単独に又は他の1以上のポリマーとの組み合わせで(共有結合しているかどうかは問わない)使用することができる。

上記(a)〜(m)のペプチドのアミノ酸配列の配列サブセットを含み、かつGP1b及び/又は巨核球系統の細胞表面に発現したGP1bに対するvWFの結合を阻害するペプチドをその範囲として含む。

本発明の別の特徴によれば、本発明の範囲には、ペプチド又は他のポリマーのシステインダイマーが含まれる。このようなダイマーは、ペプチド又はポリ

マーのシステイン残基が、ジスルフィド橋を通して他のペプチド又はポリマーのシステイン残基に共有結合によって結合している化合物である。本発明で利用できる好ましいシステインダイマーは、SDKFPVYKYPGKGCPTLGDEGDTLDYDYのペプチドのダイマーである。本発明で使用するvWF結合分析のin vitro条件下で、好ましいダイマーはvWF結合を阻害する上で特に効果的であった。

本発明の更に好ましい特徴においては、GP1b及び/又は巨核球系統細胞の表面で発現したGP1bへのvWFの結合を阻害し、かつ以下のドメインを有するポリマーが含まれる。

ドメインA 本発明のペプチド又はそのペプチドのアミノ酸配列のサブセットを構成する一連のアミノ酸；

ドメインB 本発明のペプチド又はそのペプチドのアミノ酸配列のサブセットを構成しかつ上記ドメインAと同一であっても異なってもよい一連のアミノ酸；及び

ドメインC ドメインAとドメインBとを結合するリンカー

上記ポリマーのセグメントを結合するリンカーは、例えば、メチレン、ビニル、アミノ酸及びデキストランのようなモノマー単位又はポリマー単位を含むことができる。本発明の実施で使用する好ましいポリマーは、ドメインAが上記(a)のペプチドを含み、ドメインBが上記(m)のペプチドを含むものである。更に好ましくは、ドメインAが上記(a)のペプチドのアミノ酸配列のサブセットを含み、ドメインBが上記(m)のペプチドのアミノ酸配列のサブセットを含むポリマーを使用することである。

上記型のポリマーは、ポリマーに望ましい機械的特性、例えば改良された結合性又は溶解性を提供する1又は2以上の付加的なドメインを含むことができる。

更に、本発明は、GP1b及び/又は巨核球系統細胞表面に発現したGP1bに対するvWFの結合を阻害し、かつGP1bα鎖のアミノ酸の1以上の配列を含む合成ポリマーをその範囲として含む。このアミノ酸配列は、天然コンフォメーションにおけるGP1bα鎖の表面又はその近くに通常位置し、vWFと相互作用できる。

本発明はまた、本発明のペプチド又は他のポリマーの誘導体をその範囲に含む。かかる誘導体は、付加的なポリマー配列の付加によって又は、例えばアセチル、グリコシル又はエステル部分などの官能性基の付加によって修飾されているペプチド又はポリマーを含む。

血小板へのvWFの結合を阻害する多くの重畳するGP1bαペプチドの有用性に関して本発明を評価するために、グリコカリシンの45 kDaアミノ末端トリプシン分解フラグメントのアミノ酸配列に基づくペプチドをKoughonらのProc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5135 (1985)に記載のように合成した。Vicenteら、J. Biol. Chem. 268(34): 18473-18479 (1988)を参照。

ペプチドの固相合成の周知の操作において、所望のペプチドは、ベンズヒドリルアミン又はクロロメチル化樹脂(聚糖ポリスチレンに由来し、化学供給会社から市販されている)のような不溶性支持体から出発して構成される。所望のペプチドのカルボキシル末端にあって、αアミノ基及び他の反応性部位に保護基を有するアミノ酸は、公知のペプチド結合技術を使用して、層から樹脂に結合される。αアミノ基上の保護基を除去し(もし存在すれば、他の保護基をそのまま残し)、次いで所望の配列の次のアミノ酸(適当な保護基を有する)を結合するなど。所望のペプチドが完成した時に、そのペプチドを樹脂支持体から分離し、全ての保護基を除去し、ペプチドを回収する。適当な保護基には、αアミノ基に対してはα-tert-ブチロキシカルボニル；システインのチオール基、アスパラギン酸のβ-カルボン酸基、グルタミン酸のγ-カルボン酸基並びにセリン、トレオニン及びチロシンのヒドロキシ基に対してはベンジル、4-メトキシベンジル又は4-メチルベンジル；ヒスチジン及びトリプトファンの変性基並びにリジンのε-アミノ基に対してはベンジロキシカルボニル基若しくはその2-クロロ-又は3、4-ジメトキシ誘導体；アスパラギン及びグルタミンのアミド基に対してはp-ニトロフェニル；及びアルギニンのグアニジン基に対してはニトロ又はトリルが挙げられる。

本発明のクローニングの特徴に関しては、GP1bα又はそのフラグメントは以下の戦略によりクローニングされる。もしcDNAが利用できれば、mRNAのPCRのためにオリゴヌクレオチドを選択することができる。このことは、適当なレ

ベルのmRNAを発現する細胞系を使用できることを前提とする。mRNAが稀少なものと考えられる場合には、特定のPCR増幅を実行する前に、所望のメッセージャーを増幅するためにサブトラクティブ・ハイブリタイゼーション法を使用することもできる。可能なイントロン配列の存在を簡単に測定できるか又はクロニンの後の使用に対して何ら影響を与えないと仮定すると、ゲノムDNAから所望の配列を増幅するのにオリゴ体を使用することができる。

蛋白質に対する抗体が利用できるならば、mRNAを含むポリソームを析出させ、mRNAを精製し、複製して引き続いてクロン化できる2本鎖cDNAにすることができる。細胞系が蛋白質を豊富に産生するならば、まず発現ベクターを使用してcDNAライブラリーを構成し、次いでこのライブラリーを発現クロンに結合する抗体によってスクリーニングすることができる。

蛋白質配列が利用できる場合には、cDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングするのに使用できるオリゴヌクレオチドを選択することができる。アミノ酸のコドンの使用が正確に分らないので、オリゴヌクレオチドの混合セットを選択する必要がある。

本発明の好ましい態様の実施に必要な要素には、以下のものがある。

- (A) GPIb α ポリペプチドの残基 1-810¹又はHis¹~Leu¹¹¹又はHis¹~Ala¹¹¹ドメインをコードするDNA配列、
- (B) 上記ドメインの真核細胞中での発現を指示することのできる発現プラスミド又はウィルス発現ベクター、及び
- (C) その発現を行うことのできる真核宿主細胞。

そのように発現したGPIb α ポリペプチドは、シグナルペプチドの新生GPIb α ポリペプチドへの接合がないために、宿主細胞から分泌されないことが予想される。そこで発現した蛋白質の精製及びその化学的に有用な量の抽出は、宿主細胞の培養にポリペプチドが分泌されるようになっている場合と比べて困難であると考えられる。このような発現系はそれでも患者におけるvWFの適当な機能の試験のような診断分析の目的にとっては有用であることが期待される。

従って、本発明の好ましい実施の態様においては、適当な宿主細胞に挿入されるGPIb α をコードするDNA配列が提供される。この適当な宿主細胞におい

ては、そのGPIb α コード配列の残基1-810又は1-302をコードする配列の上流にGPIb α シグナルペプチドをコードするDNA配列が挿入されている。他の蛋白質種に対応するシグナルペプチドは、GPIb α の分泌を生じさせるのに同等の効果を有することが分かった。von Heijne, G.のJ. Mol. Biol. 184:99-105 (1985)参照。

シグナルペプチドは、残基1-810又は1-302 GPIb α (a) ポリペプチドのアミノ末端に結合すると、ポリペプチドが細胞から最終的に分泌されるために迅速に得る型のポリペプチドとして細胞構造によって認識されるようにし、同時に成熟GPIb α ポリペプチドからシグナルポリペプチドが分断される。

広範囲の発現プラスミド又はウィルス発現ベクターがGPIb α ポリペプチド又はそのアミノ末端領域の発現に対して適している。発現系の選択の上で重要な要因の一つは、クロニングしたGPIb α 挿入物に隣接して高効率の転写プロモーターを提供することである。

発現プラスミド又はウィルス発現ベクターを選択する上での重要な別の要因は、安定した形質転換真核性宿主細胞に対する連続的な選択を行えるように抗生物質耐性遺伝子マーカーを提供することである。

本発明の実施において適当なプラスミドとしては、pCDM8、pCDM8⁺、pCDNA1、pCDNA1⁺、pWAM⁺及びpRC/CMVが挙げられる。本発明で使用するのに好ましいプラスミドには、pCDM8⁺、pCDNA1⁺、pWAM⁺及びpRC/CMVがある。GPIb α ポリペプチドをコードするDNA又はそのフラグメントは、細菌系においてポリペプチドを発現するプラスミド又はベクターに挿入することができる。

本発明の実施に通ずる数種のウィルス発現ベクター系があり、レトロウィルスに基づくもの及びバキュロウィルスに属するAutographa californica核多角体ウィルスに基づくものが含まれる。

本発明の実施に適合する系統的な細胞系を含む代表的な宿主細胞には、CHO-K1チャイニーズハムスター卵巣細胞(ATCC-CCL-81); COS-1細胞、即ち、SV-40で形質転換したアフリカ緑ザル腎臓細胞(ATCC-CRL1850); ATT20マウス下体細胞; RIN-5Fラット

脾臓B細胞; 培養昆虫細胞、即ち、Spodoptera frugiperda¹; 又は酵母(Saccharomyces)が挙げられる。実施例9及び10は、GPIb α ポリペプチド又はそのアミノ末端ドメインを発現するのに使用される好ましい操作の詳細な説明を含む。

治療組成物

本発明の1以上のポリペプチドを配合して、治療、診断又はその他の使用のための薬学製剤を調整することができる。例えば、静脈投与用の薬学製剤を調整するためには、組成物を、生理学的に適合性のある物質、例えば塩化ナトリウム(例えば、0.05-2.0M)、グリシンなどを含み、かつ生理学的条件に適合する緩衝化されたpHを有する水に溶解する。この水及び生理学的に適合性を有する物質は薬学的に許容し得るキャリアーを含む。

本発明の45 kDaポリペプチドについては、血栓症の予防又は治療のため投与する量は、患者が血栓症に罹っている症状によって異なるが、特定の患者に対して直ちに決定することが出来る。

抗体

抗体、特にコンフォーメーション依存性抗体は、高分子の構造及び機能を分析する上で有力な手段である。高分子相互作用をブロックすることによって、抗体はまた重要な治療上の有用性を有し得る。従って、本発明は、GPIb α ポリペプチド又はその1以上の配列サブセットを含むポリペプチドに対して特異性のある抗体を含む。この抗体は、本発明のポリペプチドによって動物を免疫し、生じた抗体を分離することからなる工程によって製造される。本発明のポリペプチドで動物を免疫するために適する多くのプロトコルが知られている。

実施例

以下の実施例は、本発明のペプチド又はポリペプチドの生物学的活性及び本発明を実施するのに有用な例示的なクロニング方法を説明する。

実施例1

vWFの血小版に対するリストセチン誘起結合の阻害

本発明のペプチドの阻害活性を試験するために、最終濃度が 1×10^{-11} Mでフォルマリン固定血小版を使用した。分析されるペプチドを種々の濃度で加えた。最終容積の3分の1のvWF不足血漿を添加し、次いで最終濃度5 μ g/mlで¹²⁵I-vWFを添加した。リストセチンを1.0 mg/mlの濃度で添加した。室温で30分置置した後、混合物を20%サクロース、300 μ Mを通過して、1200 gで4分間遠心分離を行うことによって、結合及び遊離vWFリガンドを分離した。血小版ペレットを次いで混合物の懸液から分離して、血小版結合放射能を測定した。非特異性結合は、50倍過剰の非標識vWFの存在下でかつペプチドの不存在下における¹²⁵I-vWFの残留結合として定義される。

所定のペプチドによる%阻害率は、ペプチド不存在下における特定のcpmを割ることによって算出した。試験したペプチドに対するIC₅₀値(50%結合を阻害するペプチド濃度)を以下の表4に示す。

表4	
(KR) ₁	9及び15 μ M (2つの実験)
(KR) ₂	13 μ M
(KR) ₃	120 μ M
(KR) ₄	200 μ M
(KR) ₅ CDV	18 μ M
(R) ₁ CDV	6 μ M
YRCOV	>500 μ M (阻害が見られず)

試験した濃度では、いずれのペプチドに対しても完全な阻害は見られなかった。

実施例2

新鮮な血小版に対するアシアロvWFの結合の阻害

1 mlのクエン酸三ナトリウム及び2 mlのEDTAの溶液に血液を取り出すことによって、新鮮な血小版を調整した。富血小版血漿を次いで、分画遠心処

環によって調製した。血小板の量を $1 \times 10^{11}/\text{g}$ に調整した。ペプチドを種々の濃度まで添加し、 ^{125}I -アシアロー-vWFを最終濃度が $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで添加した。室温で30分温置した後、 $300 \mu\text{M}$ の20%サクロースを通して、 12000g で4分間混合物の遠心分離を行って、結合及び遊離リガンドを分離した。血小板ペレットを次いで混合物の残液から分離して、血小板結合放射能を測定した。非特異性結合は、50倍過剰の非標識-vWFの存在下でかつペプチドの不存在下での ^{125}I -アシアロー-vWFの残留結合として期してされる。

所定のペプチドによる%阻害率は、種々の濃度のペプチドを添加した時の特有のcpmを、ペプチド不存在下における特有のcpmで割ることによって算出した。試験したペプチドに対する IC_{50} 値(50%結合を阻害するペプチド濃度)を以下の表5に示す。

表5

(KR) ₁	1.5 μM
(KR) ₂	1.7 μM
(KR) ₃	2.3 μM
(KR) ₄ ,GDV	1.5 μM
(R) ₁ ,GDV	3.5 μM
(R) ₂	7 μM

以下の表5で示すように、完全な阻害は以下の濃度で見られた。

表6

(KR) ₁	1.2及び1.5 μM
(KR) ₂	6及び7 μM
(KR) ₃	6.0及び12.0 μM
(KR) ₄ ,GDV	4.4 μM
(R) ₁ ,GDV	2.4 μM

実施例3

リストセチン誘起血小板凝集の阻害

ペプチドを、 37°C 、5分間高血小板血漿とともに温置した。アシアロー-vWFを $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度で添加した。反応混合物を、シリコン化したガラスキューベットに準備し、次いでルミ(Lumi)アグリゴメーター(Chrono-Log Corp.製)に 37°C で置き、 1200rpm で血小板懸濁液を一定して攪拌した。凝集は、攪拌血小板懸濁液を通る光透過率の増大をモニターすることによって定量化した。ペプチドによる凝集の阻害は、以下の表9に示す。

表9

(KR) ₁	100%阻害
(KR) ₂	88%阻害
(KR) ₃	重要な阻害はなかった。
(R) ₁ ,GDV	92%阻害

実施例5

GP1b α 受容体部位の特定

GP1b α の鎖のアミノ末端細胞外領域(残基1~283)が、GP1b複合体の他の成分又は他の血小板膜成分の不存在下でvWFと相互作用するドメインを含むことは以前に立証されている。Vicenteら。

本発明の研究は、この相互作用の受容体部位を特定することにある。この45 kDaの結合フラグメントの全アミノ酸配列は、vWF結合阻害分析に使用される、一連の27の重複する合成ペプチドとして再生された。

vWFの血小板への結合阻害率(%)は、Ruggeriらの方法に従って調製された ^{125}I 標識vWFを使用して測定された。DeMarcoらのJ. Clin. Invest. 68:321-328(1981)も参照。リストセチン及び/又はボトロセチンによって誘導される、vWFの血小板への結合(及びその阻害)は、MacFarlaneらのThromb. Diat. Haemorrh. 34:306-308(1975)の方法に従って測定した。この方法は、フェルムアルデヒドで固定した洗浄血小板を利用する。図1の上図には、一文字表記のGP1b α のアミノ末端細胞外領域のアミノ酸配列が示されている。T1は、45 kDaドメインの起点を提供する、トリプシン切断部位を示す。配列の上の数字は、合成ペプチド配列における第一残基を示す。その配列の下に同一数字は、その

本発明のペプチドの阻害活性を、洗浄した血小板を使用して評価した。Trapani-LombardoらのJ. Clin. Invest. 78:1950-1958(1985)に記載のように調製した血小板を、最終濃度 $3 \times 10^{11}/\text{g}$ に調整した。種々の濃度のペプチド及び、 $0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度の標識vWFを、 37°C 、5分間血小板とともに温置した。リストセチンを次いで $1.0 \text{mg}/\text{mL}$ の最終濃度で添加した。反応混合物を、シリコン化したガラスキューベットに準備し、次いでルミ(Lumi)アグリゴメーター(Chrono-Log Corp.製)に 37°C で置き、 1200rpm で血小板懸濁液を一定して攪拌した。凝集は、攪拌血小板懸濁液を通る光透過率の増大をモニターすることによって定量化した。

ペプチドの IC_{50} 値(凝集曲線の初期傾斜の%減少率によって判断した場合において、50%凝集を阻害する濃度)を以下の表7に示す。

表7

(KR) ₁	3 μM
(KR) ₂	50 μM
(KR) ₃	250 μM

100 μM の濃度において、以下のペプチドが、表8に示すような程度で凝集を阻害した。

表8

(KR) ₁	82%阻害
(KR) ₂	50%阻害
(KR) ₃	重要な阻害はなかった。
(R) ₁ ,GDV	70%阻害

実施例4

アシアロー-vWF誘起凝集の阻害

本発明のペプチドの阻害活性は、11mMのクエン酸三ナトリウムの抗凝集剤に取り出した血液を分面遠心処理することによって調製した高血小板血漿を使用して測定した。血小板数を $3 \times 10^{11}/\text{g}$ に調整した。 $55 \mu\text{M}$ の濃度のペ

ペプチドにおける最終濃度を示す。棒で示した部分は、以下の研究において使用したより長いペプチド(28残基)の配列を示す。図1の下図の図は、リストセチン依存性(黒の棒)及びボトロセチン依存性(斜線の棒)のGP1b-IXへのvWF結合に関して試験した全てのペプチドの阻害効果を棒グラフとして示す。 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の ^{125}I -vWF濃度で、500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ の最終濃度で使用する各ペプチドは、図1の上図図で使用する同一の数字によって特定される。ここで、リストセチン依存性結合は5群のペプチド(主に、番号3-4、7-9、14、21及び23-25で特定されるもの)によって阻害され、一方、ボトロセチン依存性結合は、7-10及び19-25のペプチドによってのみ大きく阻害されたことを明記すべきである。ペプチド25は、両分析系に基づくと、阻害剤として最も期待されるものである。

実施例6

GLY¹¹¹~GLU¹¹³フラグメントの活性分析

実施例5で議論したように、図1は、グリコカリシンの配列GLY¹¹¹~GLU¹¹³を代表するペプチド25がvWF結合の阻害剤として非常に有望であることを示している。

更に、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の一定の ^{125}I -vWF濃度及び、図2の横座標に示されるような種々のペプチド濃度で実験を行った。上図図は、ボトロセチンの存在下での残留vWF結合3点決定値の平均及び範囲を示す。下図図は、リストセチンの存在下での5点決定値の平均及び範囲を示す。残留結合は、各実験値から、飽和量の抗GP1bモノクローナル抗体Jb1の存在下での測定値を引いた後算出した。100%の結合は、ペプチドの代わりに、ヘパス(Hepes)緩衝剤の存在下で測定したものであった。

実施例7

SER¹¹¹~TYR¹¹³フラグメントの活性分析

(実施例5に対応する)図1から、ペプチド23~25が、合成ペプチド26に対して改善された結合を示すことが分かった。ペプチド26及び25の7

ミノ酸配列は重複するので、ペプチド28の末端部分を削除したペプチドを構成することによって、重要な阻害活性を示すペプチドが生成するものと考えられる。従って、グリコカリシンの配列SER***~TYR**を構成する合成ペプチドを構成し、試験した。

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の1**I-vWF膜を使用し、実施例6と同様にして結合阻害試験を行った。2つの別個の結合試験の平均及び範囲を図3に示す。

上記試験で言及した種々のペプチドを比較すると、元の28の合成ペプチドの内最も活性の強いのは、25であり、420 μM の濃度でvWFのリストセチン誘起結合の50%を阻害し、530 μM の濃度でvWFのボトロセチン誘起結合の50%を阻害することが分かった。対照的に、残基251~279を有するこの実施例でのペプチドは170 μM の濃度でリストセチン誘起結合の50%を阻害した。

vWFと結合する高い可能性を有し(選択されたドメインが、天然のGP1b α 鎖の表面に生じるために)かつ特定のグリコカリシンドメインと結合する不活性リンカー配列を使用する合成ポリペプチド阻害剤をデザインするための基礎は、Emini らのJ. of Virology 55:836-839 (1985)の方法によって示されている。これらの表面可能性(surface probability)インデックスの計算によれば、ペプチド25の15のアミノ酸の内13及びこの実施例のペプチドにおける12個の位置が4より大きい表面可能性インデックスを有することが分かる。

本実施例のペプチドが二量化できるシステインを含み、ダイマーが逆相HPLCで示されるようにvWF結合分析における濃度、pH及び時間の条件の下で実験上優先的な形態であるので、そのような二量化によって、非二量化ペプチドと比較して、vWFへの結合を高めるペプチド構造の変化を生じるものと考えられる。

実施例8

複合合成ポリマーの設計

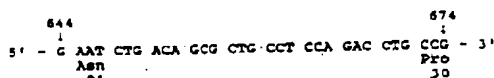
図1及び実施例5から、ペプチド8及び25が、多量性(multimeric) vWF複合体を最大限に阻害するように、vWF結合領域及び不活性スパーサー又はリンカー配列を含む複合合成ポリマーを設計するための効果的なドメインを提供

niatisらのMolecular Cloning, A Laboratory Manual, 164-170 (1982)、ニューヨーク州コールドスプリングハーバーのCold Spring Harbor Lab. 参照。

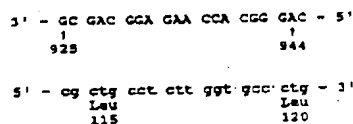
具体的に説明すると、モデル380B自動系(カリフォルニア州フォスターシティのアプライド・バイオシステムズ製)を使用して、ホスホールアミダイト(Phosphoramidite)法(Sinha らのTetrahedron Letters, 24:5843 (1983))に従って、以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

選択したオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

オリゴヌクレオチド(A):



オリゴヌクレオチド(B):



オリゴヌクレオチド(A)は、(GP1b α 遺伝子に対してWengerらの番号付系を使用して)ヌクレオチド844~874に対する非転写ストランドDNA(コード化ストランド)と同等である。

オリゴヌクレオチド(B)は、3'-5'で示され、転写ストランド(非コード化DNA)と等価である。対応するコード化鎖は、小文字により5'-3'で示される。ヌクレオチドの位置は、Wengerらに従う。

T₄キナーゼを使用して、増幅させたフラグメントの各末端にホスフェート基を付加した。T₄リガーゼを使用して、フラグメントのプラント末端を連結させ

ることが分かる。

実施例9

安定な哺乳類の形質転換体におけるGP1b α (His¹¹⁰-Leu¹¹⁶) 発現

工程1

成熟His¹¹⁰-Leu¹¹⁶ ポリペプチド発現のためのDNA配列の構成

Lopez らの公開したGP1b α のcDNA配列に基づいて、2つのフランキンギオリゴヌクレオチドを合成して、ヒトゲノムラムダ(λ) ファージライブラリーをスクリーニングするプローブとして適当であると考えられるGP1b α 遺伝子の領域をポリマーゼ・チェーン・リアクション(PCR)で増幅させた。

従って、ヒトゲノムDNAを、Saiki らのScience 239:487-491 (1988)の方法に従って、PCRにて酵素的に増幅した。この操作は、サブセグメントを増幅するための二本鎖GP1b α DNA配列と、そのサブセグメントの両端をフランキする2つの一本鎖オリゴヌクレオチドプライマーとを使用する。プライマーオリゴヌクレオチド(DNAポリマーゼ及びデオキシリボヌクレオチド三磷酸の存在下)を、増幅するDNAよりも遙かに高濃度で添加した。多数回の変性(denaturation)、オリゴヌクレオチドアニリング及び合成を行った後に蓄積する大多数のポリヌクレオチドは、クロニングによる増幅のために適した所望の二本鎖cDNAサブセグメントを提供する。

PCRは、Taqポリマーゼ(Thermus aquaticus)を使用して、DNAサーマルサイクラー(thermal cycler)(コネチカット州ノーウォークのパーキン・エルマー(Perkin Elmer)社又はカリフォルニア州バークレーのシータス(Cetus)社)で行った。1.0 μg のヒトゲノムDNAと、1.0 μg の各合成オリゴヌクレオチドプライマーと、5.0 mLのKCl、1.0 mLのトリスHCl (pH8.3)、1.5 mLのMgCl₂、0.1%のゼラチン(カリフォルニア州リッチモンドのバイオラド(BioRad)社)及び2.0 mLの各dNTPからなる緩衝剤とを含む100 μL の体積中で反応を行った。PCRの条件は、94°Cで30秒、52°Cで30秒、及び72°Cで1分という35サイクルであった。増幅したフラグメントは、2%アガロースゲルを通して電気泳動することによって精製及び分離を行った。Ma

て、M13mp18 バクテリオファージの二重鎖複製型の多量クローニング配列中にSmaI部位を形成した。ウィルスの安定な一本鎖(+)型を分離できる能力は、その中でのクローニング配列の一体化を証明するのに特に有用である。Messing のJ. Meth. Enzymology, 101:20-78 (1983)及びYanish-PerronらのGene 33:103-109 (1985)参照。従って、GP1b α DNA挿入物は、M13mp18 の一本鎖(+)型を使用する、一本鎖ジデオキシ法(サンガーらのProc. Natl. Acad. Sci. U S A 74:5463-5467 (1977))を使用することによって、完全に配列特定ができた。M13mp18 での配列特定によって、GP1b α 挿入物が長さ301の塩基対であることが分かった。このことは、対応cDNA領域(Lopez ら)がイントロン境界を含まないことを示した。301塩基対(bp)フラグメントを次いでニック翻訳に掛けた。32P-標識ヌクレオチドを導入し、フラグメントを放射能標識プローブに変えた。Rigby らのJ. Mol. Biol. 113:237 (1977)参照。

ヒト細胞DNAのEcoRI 部分消化物を使用して、ヒトゲノム λ ファージライブラリー(カリフォルニア州ラ・ホヤ(La Jolla)にあるストラタジーン(Stratagene)製のラムダfix™を使用して)を構築した。このライブラリーは、宿主としてE. coli 株 LE392を使用する。BentonらのScience 196:180-182 (1977)に記載のハイブリダイゼーション及びブラック複製操作に従ってスクリーニングした。301bpフラグメントによるスクリーニングによって、ブラック複製の4サイクルの後、6種のポジティブクローンを分離した。

各ポジティブクローンに対するライブラリースクリーニングを行うために λ ファージの適量希釈物を、一定の濃度の下で37°C、20分間細菌と一緒に温度した。融解アガロースをこの混合物に添加し、全体の内容物を、硬い寒天板を有するペトリ皿上に広げた。ペトリ皿を37°Cで一夜温度した。ニトロセルロースフィルターをペトリ皿の表面に丁寧に置くことによって、得られたバクテリオファージブラックのインプリントを作成した。ファージ粒子及びDNAは、毛細管現象によってブラックパターンの正確な複製の形でフィルターに転写した。DNAは、NaOHで変性した後、焼くことによりフィルターに不可逆的に結合させ、次いで32P-標識プローブにハイブリダイズした。非結合プローブは洗浄して取り除き、フィルターをフィルムに露光した。ハイブリダイゼー

ジョンに対してポジティブなブランクは、フィルムを元の寒天プレートと整合させることによって特定した。これらのブランクは個々に採取し、増幅した。一般に、ファージの初期の増殖濃度は、個々のブランクを採取できず、その代わり幾つかのファージ種を含む領域が採取されるようなものであった。この混合物は、増幅し、低密度で再度増殖して、どの初期ポジティブ体が本当のポジティブ体であるのかを決めるために再スクリーニングし、また各ポジティブ体をブランク増殖した。このような再スクリーニングを3回行った後、個々にポジティブなハイブリダイズ化ファージを分離し、更に特選を行った。

次いで、複製λ DNAは、Maniatisらの操作 (76-85 頁) に従って、それぞれの細胞溶解 *E. coli* LE 392 サンプルからファージを析出させることによって、各スクローンから分離した。

6種のポジティブスクローンからのDNA、1 μgのサンプルをEcoRIで消化した。EcoRI消化物は、次いでアガロース中での電気泳動によって分子量に基づく分離を行った後、ニトロセルロースに転写し、³²P-標識301bpフラグメントを使用するオートラジオグラフィで特定した。サザーンのJ. Mol. Biol. 98:503 (1975) 参照。約6000塩基対のEcoRIフラグメントが認識された。

可視化しかつアガロースゲルから抽出した約6000塩基対フラグメントは、EcoRI部位においてpBluescript KS-プラスミド (カリフォルニア州ラ・ホラのストラタジーン製) にクローン化した。次いで、プラスミドは、*E. coli* 株 XL-1 Blue (ストラタジーン製) で増殖させた。プラスミドは、アルカリ細胞溶解操作 (Birnbom-Doly のNucleic Acids Research 7:1513 (1979)) によって宿主 *E. coli* から回収した後、Maniatisら (1.42) に従ってCsCl/エチジウムブロマイド平衡遠心操作によって精製した。

そのように分離したプラスミドをBamHI及びBgIIIで消化して、2161塩基対フラグメント (Wenglerの番号付系を使用すると、ヌクレオチド503〜2863) を形成した。このフラグメントは、開始METコドン (ヌクレオチド537〜538) の上流から、LEU⁺コドン (ヌクレオチド2412〜2414) 及びTGA 翻訳終結コドン (2415〜2417) の下流まで伸びている。

ランド州ガイサースブルグ(Caithersburg)にあるGibco/Life Technologies Inc. 製) に対する耐性を付与する。

ネオマイシン耐性マーカーを含む幾つかの他の好適な発現ベクターが市販されている。その例として、pCDNA 1⁺ (カリフォルニア州サンディエゴにあるインビトロジェン製)、Rc/CMV (カリフォルニア州サンディエゴにあるインビトロジェン製) 及びpWAM⁺ (カリフォルニア州パロアルトにあるクローンテック (Clontech) 製) が挙げられる。必要に応じて、GP1αフラグメントは、これらの他の発現ベクターにおける発現能力に関して、異なる制限処理又は修飾をしてもよい。

pBluescript KS-プラスミドからのXhoI-NotI フラグメントを、XhoI及びNotIで制限処理したpCDM8⁺ 中に挿入した。アンピシリン感受性 *E. coli* 株XS-127細胞 (カリフォルニア州ラ・ホラにあるインビトロジェン製) を、Hanahan のJ. Mol. Biol. 168:557-580 (1983) の方法に従って、得られた連結DNA混合物で形質転換した。

得られたコロニーからのプラスミドは、制限地図作成及びDNA配列特定によって特選付け、意図する挿入物を含むコロニーを特定した。このような一つのプラスミド (pMWIと命名) を、*E. coli* 株XS-127中に維持し、哺乳動物細胞形質転換操作のために選択した。

スーパーコイル化したプラスミド (pMWI) は、哺乳動物細胞の形質転換に使用する前に、Birnbom-Doly のアルカリ細胞溶解操作によって、宿主 *E. coli* から回収し、次いでManiatisら (1.42) に従う、CsCl/エチジウムブロマイド平衡遠心分離によって精製した。

工程3

チャイニーズハムスター卵巣細胞の形質転換

無血清カルシウム存在トランスフェクション操作によって、pMWIをCHO-K1チャイニーズハムスター卵巣細胞 (ATCC-CCL-61) に導入した。ChenらのMol. Cell. Biol. 7(8):2745-2752 (1987) 参照。

CHO-K1細胞は、10%の熱不活性牛胎児血清 (FCS: Gibco製) と、0.5 mLの

このフラグメントのBamHI部位は、ヌクレオチド502〜507に対応し、そのBgIII部位は、ヌクレオチド2858〜2864に対応する。

次いで、2161bpフラグメントは、pBluescript KS- (カリフォルニア州ラ・ホラのストラタジーン製) のBamHI部位中に、BamHI-BgIIIフラグメントとしてクローン化した。BamHI及びBgIII制限部位は同一の内部配列: GATC/C TAGを含むので、BgIII制限部位をBamHI部位にアニールしても良い。フラグメントをT₄ DNAリガーゼによって連結しても、影響されるBgIII末端の一体性は復元しなかった。301塩基対ブランクとのハイブリダイゼーション及びアガロース上のサイズ化を繰り返した。これらのプラスミドは、*E. coli* XL-1 Blue において増殖した。

制限地図の作成を行って、*E. coli* XL-1 Blue (ストラタジーン製) のクローンの選択を行った。このクローンにおいては、含まれるpBluescript KS-プラスミド内のGP1α DNAが不活性な配向を有しているために、ポリリンカーのXhoI部位が挿入物の上流 (5') にあり、NotI部位がその下流 (3') にある。XhoI-NotI フラグメントは、適当な発現プラスミドを作るように以下のように使用される。

工程2

哺乳動物細胞へ一体化するためのプラスミドの構造

アミノ配糖体性抗生物質耐性に基づく選択操作は、適当なGP1α発現プラスミドを保持する形質転換体に対して連続的に選択するように設計した。

pCDM8 ベクター (Seedらによって開発され (Nature 329:840-842 (1987)) かつカリフォルニア州サンディエゴにあるインビトロジェン (Invitrogen) から入手可能) は、カリフォルニア州ラ・ホラにあるScipps Clinic and Research Foundation のTimothy O'Tool博士によって修正されて、ネオマイシン耐性遺伝子 (ホストトランスフェラーゼII) を含むようにされた。この遺伝子は、2000塩基対BamHIフラグメントの一部として、pCDM8 のBamHI制限部位にクローン化した。ネオマイシン (neo) 遺伝子によって生産される蛋白質はまた、他のアミノ配糖体抗生物質、例えばGeneticin® G418 サルフェート (メリー

各非必須アミノ酸 (NEAA供給会社、即ち、メリーランド州ウォークースビル (Walkersville) にあるウィッチャー (Whittaker) 製) と2.5 mLのレグルタミンとを添加したダルベッコ養性イーグル増地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM) (メリーランド州ガイサースブルグにあるGibco/Life Technologies Inc. 製) において、5% CO₂雰囲気下、37°Cで集密化 (confluence) するまで成長させ、以下の考察したようにトリプシン処理し、そして形質転換前に、60 mm組織培養皿当たり、1.25 × 10⁶ 細胞の密度 (集密の約25%) において24時間サブカルチャーを行った。CHO-K1細胞は、これらの条件下で、DMEM/10% FCSにおいて約18時間の増殖時間を有している。

形質転換を達成するために、pMWIプラスミドを、Birnbom-Doly の方法に従って、*E. coli* 株XS-127の増地から回収した。10 μgのプラスミドを、Chenらの方法に従って、無酸カルシウム溶液において各60 mm皿中の細胞に適用した。細胞は、プラスミドとともに置置した後、5% CO₂雰囲気下、37°CでDMEM/10% FCS中に保持した。

約48時間の後処理トランスフェクション及び5% CO₂雰囲気、37°Cでの成長の後、以下のように、細胞をトリプシン処理した。各皿の成長増地は、0.25%のトリプシン及び0.2% (w/v) のEDTAを含む細胞懸濁液の溶液 (37 mLのNaClと、27 mLのKClと、4.3 mLのNa₂HPO₄・7H₂O/1.4 mL K₂HPO₄ とを含み、pH 7.4)、3 mLで置換した。トリプシン処理は、3分間行った。トリプシン含有増地を除去し、更に15分間インキュベーター中に置きその後、細胞を10% FCSを含有するDMEMに再懸濁した。各皿からの細胞を20群に分け、約1.2 × 10⁶ 細胞/50mm 皿の密度 (集密状態の約2%) で増殖させた。

プラスミドDNAを一体化した安定な形質転換体の製造は、ジェネティシン (Geneticin®) G418 サルフェートで、0.8 mg/mlの濃度まで50mm 皿に添加することによって達成することができる。成長は、5% CO₂雰囲気下、37°Cで14日間続けた。生き延びた独立のコロニーを、クローニングリングを使用して12ウェルプレートに移転し、0.8 mg/mlのジェネティシンを添加したDMEM/10% FCSにて、更に7日間成長させた。このような条件下で、プレート当たり3〜7の生き延びたコロニーは、10〜14日で明らかになった。約1

0.0の安定な形質転換体は、始めに集積状態の約70%のプレート密度において、約 5×10^4 の細胞を含む、各元の60mmの皿から分離した。

LJ-P3抗GP1b α モノクローナル抗体によるスクリーニングに基づけば、G418サルフェート耐性細胞系の50%より多くの細胞系が、成熟GP1b α ポリペプチドに対応する抗体を産生する。各クローンの一体化の特定の部位によって、すべての場合に発現が阻害される。安定な形質転換体は、ジェネティジンG418サルフェート(0.8 mg/ml)を含む培地で増殖し、凍結して、連続選択を行った。

転換成熟GP1b α ポリペプチドを発現するコロニーは、緩衝剤中の細胞溶解の後で、ニトロセルロース上のドット・プロット分析によって検出した。比較例として、転換細胞抽出物を、非トランスフェクションCHO-K1細胞からの抽出物と比較した。

細胞抽出物を調製するために、非トランスフェクション又はトランスフェクションCHO-K1細胞を3.5mlのEDTAで採取し、pH7.5の、0.25MトリスHClに再懸濁した(10⁶細胞/ml)。凍結及び溶解を3サイクル行うことによって細胞を溶解し、12000gで遠心分離を行い、細胞膜を除去した。得られた上澄は、細胞抽出物として-70℃で保存した。

分泌されたGP1b α 抗原を含む培地のサンプルを調製するために、FCS含有培地で成長させた、80%集積の非トランスフェクション又はトランスフェクションCHO細胞を、血清のない媒体で一洗浄し、次いでL-グルタミン及び非必須アミノ酸を補充した、血清のない媒体を供給した。24時間後、培地を収集し、12000gで遠心分離して、細胞膜を除去した。対応する上澄を集め、使用するまで保存した。GP1b α の天然コンフォメーションを認識するモノクローナル抗体LJ-[b] (Hanadaら)及びLJ-P19を、一次抗体として使用した。FrakerらのBiochem. Biophys. Res. Commun., 80:849-857 (1978)の方法によって標識した、二次抗体(¹²⁵I-ラビット抗-マウスIgG)を、ニトロセルロースシート上で25℃、2時間温置した。洗浄後、ニトロセルロースをオートラジオグラフィで露光して、GP1b α 抗原を発現するコロニーを特定した。

pH7.1形質転換細胞からの抽出物は、還元性又は非還元性条件下でSDS-ポリ

アクリルアミドゲル電気泳動により測定した時に、79 kDaのおおよその見掛け分子量を有する糖蛋白質b α 抗原を副成分として含む。このバンドは、グリコシル化のない、全長の糖蛋白質b α 鎖(残基1-610で、シグナルペプチドを有さない)を示した。79 kDaポリペプチドは、抗GP1b α モノクローナル抗体LJ-[b]と反応する。この抗体は、還元型又は非還元型を問わず、酸性(α)ポリペプチドのアミノ末端領域に、そのエピトープを有する。相対的に少割合のこの種類のポリペプチドは、その固有の非安定性及び急速な蛋白質分解プロセッシングを示す。適正に組み上げられない、オリゴ体の膜複合体(例えば、GP1b α ・GP1b β ・GP1bIX)は、小胞体を超えて転送されず、細胞内で分解される。従って、同時に(β)及び(IX)遺伝子の発現なくして、(α)遺伝子が発現することは、(α)ポリペプチド又はその生物学的に活性な形態を分離するには至らないと考えられる(Lopez, J.A.らのCirculation, 82(4): 597a (1990); Krangel, M.S.らのCell, 18:975-991 (1979); Woods, C.M.らのCell, 40:959-969 (1985); Minami, Y.らのProc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2688-2692 (1987) 参照)。

予想させるように、79 kDaポリペプチドは、pH7.1形質転換細胞からの培地には検出されなかった。その代わり、かかる培地から分離された主要なGP1b(α)ポリペプチドは、GP1b α の適切なグリコシル化アミノ末端ドメインの特徴的な45 kDaのおおよその見掛け分子量を有する。この種のポリペプチドがpH7.1形質転換細胞の培地中に存在することによって、GP1b α のアミノ末端ドメインが分泌性蛋白質としてプロセッシングされ、全長のGP1b α ポリペプチドの通常の蛋白質分解作用にも関わらず、GP1b α 複合体の他の成分の組み立てがなくても、構造的な完成域に達することが分かる。

しかしながら、全長のポリペプチドを更に実質的に発現し、それを適当に折り畳みかつグリコシル化することを許容する、安定した細胞系が見出されることが期待される。以下で説明するように、His¹ ~ Ala³³³フラグメントは、天然の糖蛋白質b α に存在する三次構造の構造プロセッシングドメインに組み立てられるようにする、十分な一次配列情報を含む。おおよそHis¹からおおよそAla³³³までのアミノ酸配列と、Ala³³³のカルボキシ末端側における付加

的なGP1b α 配列とを含むポリペプチドの発現によって、45 kDaフラグメントの生物学的活性を有するポリペプチドをも生じさせることが期待される。

実施例10

安定な哺乳類形質転換体におけるHis¹ ~ Ala³³³ GP1b α フラグメントの発現

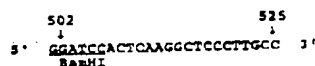
この実施例は、His¹におけるアミノ末端と、Ala³³³におけるカルボキシ末端とを有する成熟GP1b α ポリペプチドのフラグメントをコードするDNA配列が、培養哺乳類細胞で発現できかつ分泌し得る条件を示す。

以下の部分は、DNAのプライマーによって指示される増幅に関する。2181塩基対フラグメント(Wengerらに従うと、ヌクレオチド503~2664)をそのBamHI部位を含むpBluescript KSを、Saitoらの方法及び上記実施例9の全般的な操作に従って、PCRで断片的に増幅した。

モデル3808自動化システム(カリフォルニア州フォスターシティにあるアプライド・バイオシステム製)を使用して、Sinhaらのホスファールアミダイト法によって以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

GP1b α 遺伝子に対するWengerらの番号付系を使用して、ヌクレオチドを示す。

オリゴヌクレオチド(C)



オリゴヌクレオチド(D)

3' CAG TTC AAG GCG TCG TTT CG 5' → BamHIと連続

```

5'   gtc aag ttc ccc-acc aag gc   3'
    Val Ala
    296 302
(ヌクレオチド位置: 1470~1488)

```

オリゴヌクレオチド(C)は、非転写(コード化)ストランドDNAと等価である。大文字で示されているオリゴヌクレオチド(D)は、転写(非コード化)ストランドDNAと等価である。オリゴヌクレオチド(D)に対応するコード化ストランドは、5'→3'で示され、暗号化されたアミノ酸は順数3文字記号で示される。

増幅した二本鎖DNA配列3' ~部分的Ala³³³コドンにBamHIリンカーを追加して、コドンを作成させ、またDNAがBamHI導入物として機能するようにさせた。RobertsらのNature, 265:82-84 (1977)参照。

増幅フラグメントは、M13mp19バクテリオファージの二本鎖複製型の多量クローン配列内のBamHI部位にクローン化した。ウィルスの安定した一本鎖(+)型を分離できる能力は、その中にクローン化配列が一体化されていることを証明するのに特に有用である。例えば、Messing及びYanish-Perronら参照。

従って、GP1b α DNA導入物は、M13mp19の一本鎖(+)型を利用して、サンガーらの一本鎖ジデオキシ法によって、完全に配列が特定され、GP1b α フラグメントが、ヌクレオチド502~1488によって代表されかつ開始メチオニンのコドンと、シグナルペプチドの残りの15残基と、及び成熟GP1b α ポリペプチドのアミノ末端領域の残基1~302とを含むGP1b α DNAの領域に対する正確なコード化配列を含むことを確認した。

M13mp19における配列特定によって、pCDM8 *** プラスミドからの発現にと

って適切な、BamHI部位における挿入配向を有する多くのクローンが確立された。このようなクローンの一つのGP1b α 配列は、EcoRI(5')-XbaI(3')フラグメントとしてM13mp19から除去した。このEcoRI(5')-XbaI(3')フラグメントは、次いでpBluescript KS-のポリリンカー領域にクローン化した。この第2の挿入物のXhoI(5')-NotI(3')フラグメントは、次いでpBluescript KS-から除去し、pCDM8⁺にクローン化し、pW1の挿入で使用する操作(実施例9)に従ってXho及びNotIで制限処理した。

アンピシリン感受性E. coli株SX-127細胞(カリフォルニア州サンジエゴのインビトロゲン製)をHanahanの方法に従って、生成した結合DNA混合物で形質転換した。

得られたコロニーからのプラスミドは、制限地図及びDNA配列特定によって特徴付けを行い、意図する挿入物を含むコロニーを特定した。かかる一つの適当なプラスミド(pW2と表示)を、E. coli株XS-127に維持し、哺乳類細胞形質転換操作のために使用した。

スーパーコイル化したプラスミド(pW2)は、形質転換用の哺乳類細胞に使用する前に、Birnboim-Dolyのアルカリ細胞溶解操作、次いで実施例8に従うCsCl/エチジウムブロマイド平衡遠心分離操作によって、宿主E. coliから回収した。CHO-K1細胞の形質転換は、またpW1プラスミドに対する実施例9の操作に従って行った。

実施例11

pW1及びpW2プラスミドで産生したポリペプチドにおける天然三次構造の証明

(pW1及びpW2を含む)安定した形質転換細胞におけるGP1b α 抗原の存在は、CHO-K1を含む細胞からの細胞溶解物又は増地(実施例9と同様に調製)をニトロセルロースに適用することによって証明した。

10 μ gのアリコートの細胞溶解物又は増地をニトロセルロース膜(0.45ミクロンの孔サイズ:カリフォルニア州リッチモンドにあるバイオラド(Bio-Rad)製)上にスポットとして滴下し、乾燥した。蛋白質ブロック溶液である、

ントブルーで染色した。電泳ゲルからの蛋白質バンドは、37°C、18時間、950ミリアンペア/ゲルの条件下で、ニトロセルロース(0.45ミクロンの孔サイズ:カリフォルニア州リッチモンドにあるバイオラド(Bio-Rad)製)に移した。GP1b α 抗原材料は、先ずLJ-1b1モノクローナル抗体とともにニトロセルロースを温置して可視化した。この抗体のエピトープは、GP1b α の還元された35 kDaアミノ末端フラグメントに対して予め測定されたものである(Vicenteら)。

免疫反応バンドは、Frakerらの方法で標識した、二次抗体としての、¹²⁵Iウサギ抗マウスIgGを使用して、可視化した。

pW2プラスミドで形質転換したCHO-K1細胞からの、還元条件下で実施した抽出物は、不完全にプロセッシングされた先駆糖酸化物を多量有する、約80 kDaの見掛け分子量の顯著な先駆ポリペプチド種を示した(図5)。同様な条件下で試験した増地からのポリペプチドは、アミノ末端45 kDaのトリプシン分解フラグメントの公知の重量に対応する、約45 kDaの見掛け分子量のバンドとして示された。血小板からの抽出物は、予想された全長145 kDaのGP1b α ポリペプチドを示した。

実施例13

pW2プラスミドで産生したGP1b(α)ポリペプチドへのvWFのボトロセチン誘発結合

*Bothrops jararaca*の毒から抽出したボトロセチンが、多量体のフォン・ウィルブランド因子の血小板へのin vitro結合を誘発すること(ReadらのProc. Natl. Acad. Sci., 75:4514-4518 (1978))及びボトロセチンがvWFに対して、(成熟サブユニットの)アミノ酸配列位置441~733を含むその領域、従ってGP1b結合ドメインにおいて結合することが証明されている。Andrews, R.K.らのBiochemistry, 28:8317-8326 (1989)参照。この実施例は、pW2プラスミドによって安定して形質転換したCHO-K1細胞から産生されたHis⁶-Ala³ポリペプチドが機能的に活性であることを示す。

pW2形質転換CHO-K1細胞(無密又はそれに近い状態)からの増地(FCSのな

「ブロット(Blotto)」(pH 7.3の燐緩衝液で、5 mg/mlの脂肪のない乾燥ミルク、0.25 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド、0.15 MのNaCl)中に、一定の撹拌の下で、22~25°Cで2時間、膜を浸漬して、非特異性相互作用を阻害した。

上記膜は、天然GP1b α コンフォメーション要求モノクローナル抗体(5~10 μ g/mlのLJ-1b1又はLJ-P19)とともに、22~25°Cで2時間温置した。膜は、ブロットで3回洗浄した後、¹²⁵I標識ウサギ抗マウスIgG(0.08~0.16 mCi l⁻¹/ドット)の溶液に移し、22~25°Cで2時間温置した。乾燥及びオートラジオグラフィ操作(コダックARフィルムを使用)前に、ブロットで8回洗浄した。

図4は、pW1及びpW2形質転換細胞からの細胞抽出物又は増地を使用してLJ-1b1及びLJ-P19一次抗体による結果を示す。非形質転換CHO細胞からの細胞抽出物及び増地は、コントロールとして使用した。図4は、細胞溶解物又は増地から分離したものであろうかによらず、r1b α 1又はr1b α 2抗原(それぞれ、pW1及びpW2形質転換体から産生)が、天然GP1b α 中に存在する三次コンフォメーションのドメインを提供することを示す。同様の結果が、別のコンフォメーション依存性抗GP1b α モノクローナル抗体LJ-P3を使用することによって得られた。

実施例12

pW2プラスミドで産生されたGP1b α ポリペプチドの細胞内プロセッシング

代数的な細胞系からのpW2形質転換CHO-K1細胞によって産生されたポリペプチドは、Handeらの操作に従って免疫ブロット(ウェスタンブロット)により還元条件下で特徴付けを行った。BurnettらのA. Anal. Biochem., 112:195-203 (1981)も参照。

pW2ポリペプチドのジスルフィド結合は、電気泳動の前に、還元剤の不存在下で37°C、1時間、30 mMのジチオトレイトールで処理することによって還元した。電気泳動は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド10%ゲル(SDS-PAGE)上で行い、蛋白質サンプルをクーマシー(Coomassie)ブリア

イDMEX)、50 μ g/mlを、円形ニトロセルロース膜(8 mm径)とともにマイクロタイターウェルに入れ、室温で30分温置した。20 mMのヘパース(Hepes)、pH 7.4、150 mMのNaCl、及び6%の牛血清アルブミンの溶液(HEPES/BSA)でフィルターを2度洗浄した。非特異性相互作用によるバックグラウンドを最少にするために、HEPES/BSAによるブロックを4°Cで2日間、続けた。

分析を始めるために、モノクローナル抗GP1b α 抗体の30 μ g/膜(図6で具体的に示す最終濃度となるように)を、増地で被覆したニトロセルロース膜とともに室温で15分温置した。10 μ g/mlの¹²⁵I-vWFと、10 μ g/mlのボトロセチン(ミズーリ州セントルイスにあるシグマ製)からなる混合物を、室温で5分予め温置し、マイクロタイターウェルに添加して、更に15分温置した。得られたボトロセチン濃度は5 μ g/mlであった。フィルターをHEPES/BSAで4度洗浄した。結合¹²⁵I放射能を、各ニトロセルロースフィルターに対して測定し、r1b α 2へのボトロセチン誘起vWF結合を測定した。

図8は、His⁶-Ala³ GP1b α ポリペプチドの機能活性を示す。抗GP1b α モノクローナル抗体LJ-1b1(100 μ g/ml)及びLJ-P10(100 μ g/ml)は、LJ-1b1及びLJ-P10がGP1b α -vWF相互作用の公知の阻害剤であることから予想されるように、r1b α 2ポリペプチド-vWF相互作用を實質的に阻害した。LJ-1b1は、GP1b α の天然のコンフォメーション依存性エピトープを認識する。Handeら及びVicenteらを参照。

図8はまた、モノクローナル抗体「LJ-P3」及び「229」がr1b α 2-vWF相互作用を阻害しないことを示す。抗体LJ-P3及び229が各々GP1b α 及びvWFのエピトープを有するとしても、それらがvWFの血小板への結合を非常に弱くしか阻害しないので、このことは予想されたことである。

実施例14

pW2プラスミドで産生されたGP1b α ポリペプチドへの¹²⁵I-vWFのリストセチン誘発結合

この実施例は、pW2プラスミドで安定して形質転換したCHO-K1細胞によって産生されたHis⁶-Ala³ポリペプチドが機能的に活性であることを示す。分析

を実施するために、酵素結合免疫濾過技術 (ELISA) に使用する装置を、組換え pM2ポリペプチドの不溶化と組み合わせて使用した。4.5 kDa GPIb α フラグメントを、96 ウェルサンプル適用プレートと減圧室との間においたニトロセルロース膜 (0.45 μ の孔サイズ) 上に不溶化した。市販の濾過材料及びポンプ材料を使用した。

4.5 kDa フラグメントの不溶化は、pM2形質転換 CHO細胞からの培地、2.0 μ l 容積が5分間にわたってニトロセルロース膜を通して減圧吸引されるようにすることによって行った。膜の蛋白質結合容量は、2.0 ml のヘパース、pH 7.4、1.5 μ M の NaCl 及び 1 % w/v 牛血清アルブミンを含む HEPES/BSA 緩衝剤 (カリフォルニア州ラ・ホヤにあるカルバイオケム (Calbiochem) 製) の3回連続 2.0 μ l アリコートをしてその膜に通すことによって飽和させた。

上記操作の完了後、非特異的相互作用によるバックグラウンドを最少化するために、予めリストセチン (ミズーリ州セントルイスにあるシグマ化学社製) とともに温置した 125 I-VWF を含む HEPES/BSA、5.0 μ l 体積を、5分間にわたって再度ニトロセルロース膜を通して減圧吸引した。5.0 μ l のアリコートでの予温置は、種々の濃度のリストセチン (0 ~ 2.0 mg/ml) 及び特定の量の 125 I-VWF (1.13×10^5 cpm/mg の特異的活性を有する 0.25 μ g/ml) を使用して、30分、室温で行った。

膜を乾燥し、各適用ウェルの位置に対応するディスクを切り取り、シンチレーションスペクトロメータで計量し、結合放射能を測定した。ディスクを切取る前に、膜のオートラジオグラフを撮り、ウェルからウェルへの放射能漏れのないことを確認した。

結合した 125 I-VWF 放射能は、予温置混合物で測定したリストセチン濃度の関数として測定した。コントロール (リストセチンなし) においては、ウェル当たり、ほんの約 100 カウント/分 (cpm) が検出され、1.0 ~ 2.0 mg/ml のリストセチンで予温置したウェルについては、約 850 cpm が記録された。

同様の実験を、ボトロセチンとともに 125 I-VWF を予温置 (5.0 μ g/ml 体積) することによって行った。ボトロセチンがない場合、バックグラウンドに対して実質的に何もカウントは記録されなかった。予温置することによって、約 0.5

μ g/ml 及び約 2100 cpm/ウェル以上のボトロセチン濃度が記録された。結合放射能は、予温置ボトロセチンの0及び約 0.25 μ g/ml の間で、鋭く立ち上がり、2000 cpm/ウェルに近づいた。

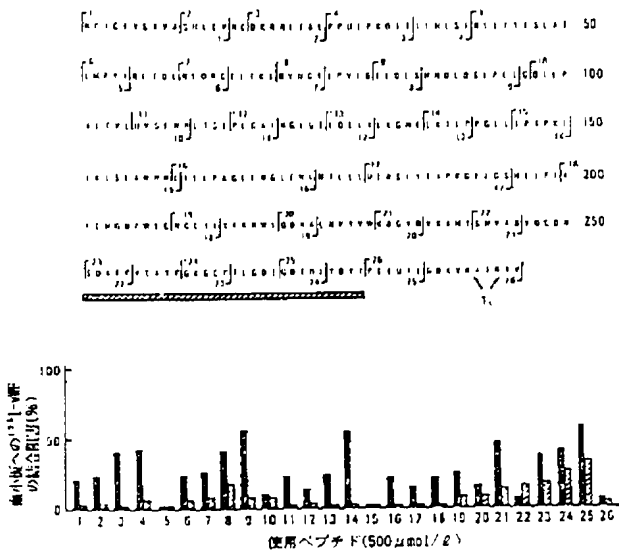


FIGURE 1

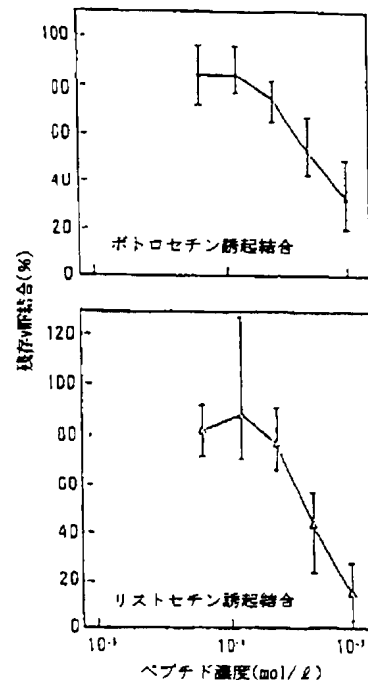


FIGURE 2

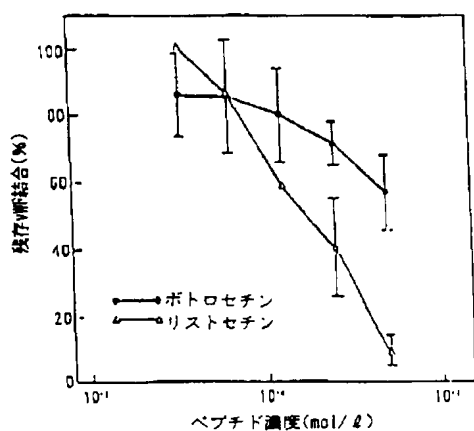


FIGURE 3

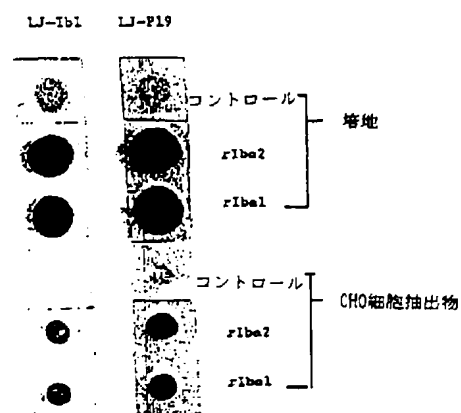


FIGURE 4

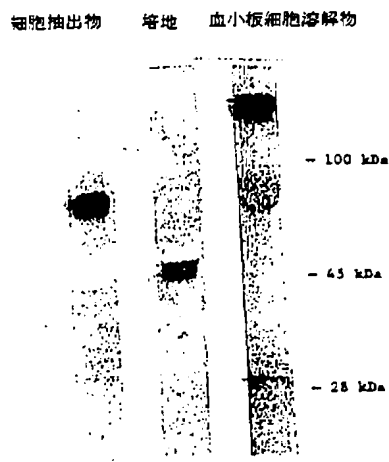


FIGURE 5

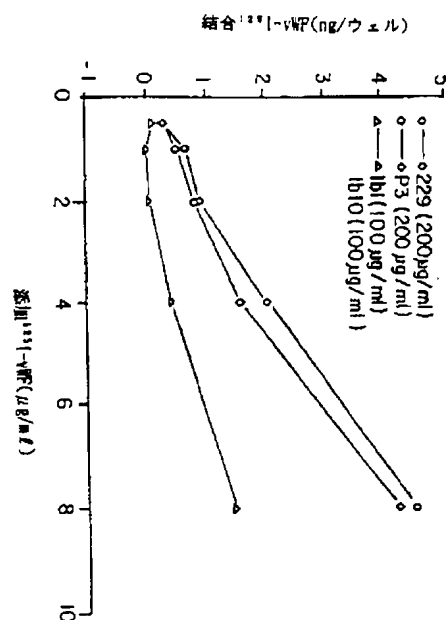


FIG. 6
ニトロセルロース膜へ不溶化した細胞外
[Ib1]αへのポトロセチン誘起 125I-vWF 結合

要約書

本発明は、血小板膜糖蛋白質Ⅰb及び／又は巨核球系統細胞表面に発現する糖蛋白質Ⅰbへのフェン・ウィルブランド因子の結合を阻害するペプチド又は他のポリマー、及び血小板の活性化、血小板の凝集への阻害、血小板の溶解又は血栓症を阻害する方法に関する。本発明はまた、血小板膜糖蛋白質Ⅰbへのフェン・ウィルブランド因子の結合を阻害するペプチドをコード化する塩基配列DNA発現ベクターであって、血小板膜糖蛋白質Ⅰbのアミノ末端領域の His¹ - Ala²⁰⁰ のアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列又はその配列サブセグメントを含むベクター、該ベクターで形質転換した哺乳類宿主細胞、並びにグリコカリシンの4.5 kDaフラグメントの固定化誘導を有するペプチドを製造する方法又は全長GPIIbポリペプチド (His¹ - Leu¹¹¹) 又はそのサブフラグメントを発現する方法に関する。

國際調查報告

U. S. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If known, classification of U. S. Government property should also be indicated)			
Administrative Classification of Foreign Information (If known, classification of U. S. Government property should also be indicated) (CPLS): A51X 37/10, C57K 330, 340, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1110, 1120, 1130, 1140, 1150, 1160, 1170, 1180, 1190, 1200, 1210, 1220, 1230, 1240, 1250, 1260, 1270, 1280, 1290, 1300, 1310, 1320, 1330, 1340, 1350, 1360, 1370, 1380, 1390, 1400, 1410, 1420, 1430, 1440, 1450, 1460, 1470, 1480, 1490, 1500, 1510, 1520, 1530, 1540, 1550, 1560, 1570, 1580, 1590, 1600, 1610, 1620, 1630, 1640, 1650, 1660, 1670, 1680, 1690, 1700, 1710, 1720, 1730, 1740, 1750, 1760, 1770, 1780, 1790, 1800, 1810, 1820, 1830, 1840, 1850, 1860, 1870, 1880, 1890, 1900, 1910, 1920, 1930, 1940, 1950, 1960, 1970, 1980, 1990, 2000, 2010, 2020, 2030, 2040, 2050, 2060, 2070, 2080, 2090, 2100, 2110, 2120, 2130, 2140, 2150, 2160, 2170, 2180, 2190, 2200, 2210, 2220, 2230, 2240, 2250, 2260, 2270, 2280, 2290, 2300, 2310, 2320, 2330, 2340, 2350, 2360, 2370, 2380, 2390, 2400, 2410, 2420, 2430, 2440, 2450, 2460, 2470, 2480, 2490, 2500, 2510, 2520, 2530, 2540, 2550, 2560, 2570, 2580, 2590, 2600, 2610, 2620, 2630, 2640, 2650, 2660, 2670, 2680, 2690, 2700, 2710, 2720, 2730, 2740, 2750, 2760, 2770, 2780, 2790, 2800, 2810, 2820, 2830, 2840, 2850, 2860, 2870, 2880, 2890, 2900, 2910, 2920, 2930, 2940, 2950, 2960, 2970, 2980, 2990, 3000, 3010, 3020, 3030, 3040, 3050, 3060, 3070, 3080, 3090, 3100, 3110, 3120, 3130, 3140, 3150, 3160, 3170, 3180, 3190, 3200, 3210, 3220, 3230, 3240, 3250, 3260, 3270, 3280, 3290, 3300, 3310, 3320, 3330, 3340, 3350, 3360, 3370, 3380, 3390, 3400, 3410, 3420, 3430, 3440, 3450, 3460, 3470, 3480, 3490, 3500, 3510, 3520, 3530, 3540, 3550, 3560, 3570, 3580, 3590, 3600, 3610, 3620, 3630, 3640, 3650, 3660, 3670, 3680, 3690, 3700, 3710, 3720, 3730, 3740, 3750, 3760, 3770, 3780, 3790, 3800, 3810, 3820, 3830, 3840, 3850, 3860, 3870, 3880, 3890, 3900, 3910, 3920, 3930, 3940, 3950, 3960, 3970, 3980, 3990, 4000, 4010, 4020, 4030, 4040, 4050, 4060, 4070, 4080, 4090, 4100, 4110, 4120, 4130, 4140, 4150, 4160, 4170, 4180, 4190, 4200, 4210, 4220, 4230, 4240, 4250, 4260, 4270, 4280, 4290, 4300, 4310, 4320, 4330, 4340, 4350, 4360, 4370, 4380, 4390, 4400, 4410, 4420, 4430, 4440, 4450, 4460, 4470, 4480, 4490, 4500, 4510, 4520, 4530, 4540, 4550, 4560, 4570, 4580, 4590, 4600, 4610, 4620, 4630, 4640, 4650, 4660, 4670, 4680, 4690, 4700, 4710, 4720, 4730, 4740, 4750, 4760, 4770, 4780, 4790, 4800, 4810, 4820, 4830, 4840, 4850, 4860, 4870, 4880, 4890, 4900, 4910, 4920, 4930, 4940, 4950, 4960, 4970, 4980, 4990, 5000, 5010, 5020, 5030, 5040, 5050, 5060, 5070, 5080, 5090, 5100, 5110, 5120, 5130, 5140, 5150, 5160, 5170, 5180, 5190, 5200, 5210, 5220, 5230, 5240, 5250, 5260, 5270, 5280, 5290, 5300, 5310, 5320, 5330, 5340, 5350, 5360, 5370, 5380, 5390, 5400, 5410, 5420, 5430, 5440, 5450, 5460, 5470, 5480, 5490, 5500, 5510, 5520, 5530, 5540, 5550, 5560, 5570, 5580, 5590, 5600, 5610, 5620, 5630, 5640, 5650, 5660, 5670, 5680, 5690, 5700, 5710, 5720, 5730, 5740, 5750, 5760, 5770, 5780, 5790, 5800, 5810, 5820, 5830, 5840, 5850, 5860, 5870, 5880, 5890, 5900, 5910, 5920, 5930, 5940, 5950, 5960, 5970, 5980, 5990, 6000, 6010, 6020, 6030, 6040, 6050, 6060, 6070, 6080, 6090, 6100, 6110, 6120, 6130, 6140, 6150, 6160, 6170, 6180, 6190, 6200, 6210, 6220, 6230, 6240, 6250, 6260, 6270, 6280, 6290, 6300, 6310, 6320, 6330, 6340, 6350, 6360, 6370, 6380, 6390, 6400, 6410, 6420, 6430, 6440, 6450, 6460, 6470, 6480, 6490, 6500, 6510, 6520, 6530, 6540, 6550, 6560, 6570, 6580, 6590, 6600, 6610, 6620, 6630, 6640, 6650, 6660, 6670, 6680, 6690, 6700, 6710, 6720, 6730, 6740, 6750, 6760, 6770, 6780, 6790, 6800, 6810, 6820, 6830, 6840, 6850, 6860, 6870, 6880, 6890, 6900, 6910, 6920, 6930, 6940, 6950, 6960, 6970, 6980, 6990, 7000, 7010, 7020, 7030, 7040, 7			

[illegible]

DOCUMENTS CONTINUOUS TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE ABOVE SHEET)			
Category	Origin of Document	For Release, Where Applicable, at the Request of:	Excluded to Classify
A	US.A. 4,703,039 (Hawiger et al.) 27 October 1987. See entire document.	1-2, 12-13, 14, 18-29, 30-46 18-29, 30-46, 30-46	
Y	US.A. 4,661,471 (Hawiger et al.) 28 April 1987. See Summary of Invention.	1-2, 12-13, 14, 18-29, 30-46, 48, 30-46	
Y	US.A. 4,566,884 (Hawiger et al.) 19 May 1987. See summary of Invention	1-2, 12-13, 14, 18-29, 30-46, 30-46, 48, 30-46	
A	US.A. 4,683,281 (Zimmerman) 28 July 1987. See entire document.	1-2, 12-13, 14, 18-29, 30-46, 48, 30-46	
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 86, issued August 1987, Lopez et al., "Cloning of the c chain of human platelet glycoprotein Ib: A transmembrane protein with homology to leucine-rich M ₂ -glycoprotein, see abstract.	1-2, 12-13, 14, 18-29, 30-46, 30-46, 48, 30-46	
Y	Chemical Abstracts, Vol. 104, issued 1986, Michelson et al., "Partial Characterization of a binding site for von Willebrand Factor on glycosylated", see page 438, column 2, abstract No. 104:8013j.	1-2, 12-13, 14, 18-29, 30-46, 30-46, 48, 30-46	

PCT/US91/00087

Continuation of Part VI Observations where unity of invention is lacking

- III That group comprising the derivatives of peptide containing additional peptide sequences. Classified in Class 530, subclass 325, (claims 11 and 16) and each species of peptide included in the claims.
- IV That group comprising the polymer and method of using the polymer classified in class 514, subclass 12, (claims 16-29, 32-33) and each species of the polymer included in the claims.
- V That group comprising the method of inhibiting thrombosis in a patient using Ser²²¹-Tyr²⁷⁹, classified in class 514, subclass 12, claims (30-31)
- VI That group comprising the pCDM8-based plasmid, recombinant DNA, a mammalian host cell transform, a process for producing a polypeptide, a viral expression vector, a DNA sequence encoding fragment, A recombinant endocytotic or prokaryotic host cell classified in class 535 subclass 320.1, (Claims 34-56, 59-60) and the species of each product above.
- VII That group comprising a biologically active polypeptide of His¹-Thr¹⁰¹ or His¹-Ala¹⁰², classified in class 530, subclass 350 (claims 57-58 and 61-64) and the species of His¹-Thr¹⁰¹ or His¹-Ala¹⁰².
- VIII That group comprising the antibody classified in class 530 subclass 387, (Claim 65).
- IX That group comprising the process for expressing a polypeptide classified in class 535 subclass 240.2 (claims 66-67) and each species of peptide included in the claims.

The inventions listed as Groups I-IX do not meet the requirements for Unity of Invention for the following reasons: the intermediate of Group I can be used to inhibit thrombosis as well as prepare the products of Groups II, III and IV, there is no correlation between the peptides of Group I and the method of Group V, the products and methods of Group VI, the active peptide of Group VII, the antibody of Group VIII or the process of expressing the polypeptide of Group IX. Each invention in Groups IV-IX are not dependent upon Group I for novelty and therefore there is a lack of any unity between the inventions of said Groups.

During a telephonic requirement for election, on 08 May 1991 applicant's representative, Mr. Alexis Barron, elected the invention of Groups IV and VII and the species of Group I-MLDRCELTLALQVDOT.
Group IV- A-QVDOTLPVLQTLQDL
S-SKKFPVYKYPQKGLPTLQDEQDTLQDLYDYV
Group VII His¹-Ala¹⁰² for examination.

Applicant's representative also authorized the charging to the Deposit Account for payment of additional examination fees totaling \$300 for the examination of said inventions. The additional examination fees have been charged to Deposit Account Number 19-5425.

Any inquiry concerning this communication should be directed to Lester L. Lee at telephone number (703) 308-3997.

第1頁の続き

⑥Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号
A 81 K 37/02	ACB	8314-4C
C 07 K 7/10		8318-4H
13/00		8619-4H
15/14		7731-4H
C 12 N 5/10		
15/12		
15/62		
C 12 P 21/02	ZNA C	8214-4B
/(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:91)		
C 07 K 99:00		

優先権主張 ②1990年11月14日②米国(US)②613,083

⑥発明者	ツイーマン セオドア エス	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ボーネ ア ストリート 544
⑥発明者	ホーテン リチャード エイ	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92075 ソラナ ビーチ フ オード アベニュー 558
⑥発明者	ヴィセンテ ヴイセンテ	スペイン エ サラマンカ バツセオ デ サンヴィセンテ エツ セエネ ホスピタル クリニコウニヴェルシタリオ セルヴィシオ デ ヘマトロギア (番地なし)
⑥発明者	モウリ ヒロシ	神奈川県横浜市栄区公田町1080-71
⑥発明者	ウエア ジェリー エル	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92024 エンシニタス サマ ーヒル ドライブ 2119